

**EFEITOS CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIOS DO  
TRATAMENTO COM CAPTOPRIL EM RATOS SUBMETIDOS À  
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR COM MONOCROTALINA**

**VERÔNICA LOURENÇO WITTMER PASCOAL**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**VITÓRIA, DEZEMBRO DE 2014**

VERÔNICA LOURENÇO WITTMER PASCOAL

**EFEITOS CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIOS DO  
TRATAMENTO COM CAPTOPRIL EM RATOS SUBMETIDOS À  
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR COM MONOCROTALINA**

**Orientador(a):**

**Profa. Dra. Suely Gomes de Figueiredo**

**Co-orientador:**

**Prof. Dr. Hélder Mauad**

Tese de Doutorado  
submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas da Universidade  
Federal do Espírito Santo  
como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor  
em Ciências Fisiológicas.

**Vitória/ES, Dezembro de 2014**

---

Pascoal, Veronica Lourenço Wittmer, 1976.

Efeitos cardiovasculares e respiratórios do tratamento com captopril em ratos submetidos à hipertensão arterial pulmonar com monocrotalina. [Vitória] 2014

14, 151p. 29,7 cm (UFES, Dr. Sc., Ciências Fisiológicas, 2014)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

---

# **EFEITOS CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIOS DO TRATAMENTO COM CAPTOPRIL EM RATOS SUBMETIDOS À HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR COM MONOCROTALINA**

**Verônica Lourenço Wittmer Pascoal**

**Tese de Doutorado submetida ao programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.**

**Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, por:**

---

**Profª Drª Suely Gomes de Figueiredo – Orientadora, UFES**

---

**Prof. Dr. Helder Mauad – Co-Orientador, UFES**

---

**Profª Drª Margareth Ribeiro Moysés**

---

**Profª Drª Sonia Alves Gouveia**

---

**Prof. Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto**

**Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória, Dezembro de 2014**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES.....</b>	<b>12</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>16</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
1.0 – Animais experimentais.....	38
2.0 – Grupos experimentais.....	38
3.0 – Anestesia.....	39
4.0 – Tratamento dos animais para indução da Hipertensão Arterial Pulmonar.....	39
5.0 – Tratamento com captopril .....	39
6.0 – Cateterização da artéria e veia femoral.....	40
7.0 – Registro direto da pressão arterial e da frequência cardíaca.....	40
8.0 – Registro das pressões das câmaras cardíacas.....	41
9.0 – Registro pletismográfico de corpo inteiro.....	41
10.0 – Cálculos dos valores ventilatórios.....	43
10.1 – Fator de correção.....	44
10.2 – Outras variáveis ventilatórias estudadas.....	44
11.0 – Avaliação gasométrica.....	45
12.0 – Pesagem das câmaras cardíacas.....	45
13.0 – Determinação do índice pulmonar.....	45
14.0 – Histologia.....	46

15.0 – Avaliação dos reflexos cardiovasculares.....	48
15.1 – Barorreflexo.....	48
15.2 – Quimiorreflexo.....	48
15.3 – Reflexo Bezold-Jarisch.....	49
16.0 – Bloqueios autonômicos.....	49
17.0 – Protocolo experimental.....	50
18.0 – Drogas e substâncias utilizadas.....	51
19.0 – Análises estatísticas.....	52
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
1.0 – Avaliações hemodinâmicas.....	53
1.1 – Valores de frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial pulsátil (PP).....	53
1.2 – Medidas das pressões intraventriculares e derivadas.....	54
2.0 – Medidas de peso corporal, peso ventricular e índice pulmonar.....	58
2.1– Peso corporal, peso úmido e peso seco dos ventrículos direito e esquerdo.....	58
2.2– Valores do índice pulmonar.....	61
3.0– Avaliações ventilatórias.....	62
4.0– Avaliações gasométricas.....	65
5.0 – Avaliação autonômica.....	67
6.0 – Avaliação reflexa.....	69
6.1 – Barorreflexo.....	69
6.2 – Quimiorreflexo.....	72
6.3 – Reflexo Bezold Jarisch.....	75

7.0 – Avaliação histológica.....	78
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>82</b>
1.0 – Avaliação hemodinâmica.....	82
2.0 – Medidas de peso corporal e ventricular e Índice pulmonar.....	97
3.0 – Avaliação respiratória e gasométrica.....	101
4.0 – Avaliação autonômica.....	105
5.0 – Avaliação reflexa.....	110
5.1 – Barorreflexo.....	110
5.2 – Quimiorreflexo.....	112
5.3 – Reflexo Bezold-Jarisch.....	114
6.0 – Avaliação Histológica.....	118
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>123</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>125</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>148</b>
1.0 – Anexo I.....	148
2.0 – Anexo II.....	149
3.0 – Anexo III.....	150
4.0 – Anexo IV.....	151

## LISTA DE TABELAS

**Tabela I** - Valores de FC (bpm), PAS (mmHg), PAD (mmHg), PAM (mmHg) e PP (mmHg) dos grupos CON, MCT, CPT e MCT-CPT.

**Tabela II** - Valores das medidas derivadas das pressões ventriculares: pressão diastólica final de VD (PDF de VD), relação positiva entre a derivada de pressão e a derivada de tempo de ventrículo direito ( $dP/dT(+)$  de VD), relação negativa entre a derivada de pressão e a derivada de tempo de ventrículo direito ( $dP/dT(-)$  de VD), pressão diastólica final de VE (PDF de VE), relação positiva entre a derivada de pressão e a derivada de tempo de ventrículo esquerdo ( $dP/dT(+)$  de VE), relação negativa entre a derivada de pressão e a derivada de tempo ( $dP/dT(-)$  de VE).

**Tabela III** - Valores de peso corporal inicial e final (g), peso úmido de VD e VE (mg), peso úmido corrigido de VD e VE (mg/g), peso seco VD e VE (g), peso seco corrigido de VD e VE (mg/g) dos grupos controle CON, MCT, CPT e MCT-CPT.

**Tabela IV** – Valores gasométricos de pressão parcial arterial de oxigênio ( $P_{aO_2}$ ), pressão parcial arterial de dióxido de carbono ( $P_{aCO_2}$ ), saturação arterial de oxigênio ( $SaO_2$ ), potencial hidrogeniônico (pH) e bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) dos grupos controle CON, MCT, CPT e MCT-CPT.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Fotografia ilustrando o sistema de registro respiratório: câmara pletismográfica de corpo inteiro.

**Figura 2** – Valores da pressão sistólica máxima do ventrículo direito (PS<sub>máx</sub> de VD) (A) e do ventrículo esquerdo (PS<sub>máx</sub> de VE) (B) dos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), captopril (CPT) e monocrotalina captopril (MCT-CPT). \*\* $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. ## $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.

**Figura 3** – Valores de índice pulmonar dos animais dos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), captopril (CPT) e monocrotalina+captopril (MCT-CPT). \*\* $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. ## $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT. †† $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CPT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.

**Figura 4** – Valores de Volume Corrente (VC) (A), Frequência Respiratória (FR) (B), Volume Minuto (V<sub>min</sub>) e Ventilação Alveolar (V<sub>A</sub>) (C) dos animais dos grupos CON, MCT, CPT e MCT-CPT. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.

**Figura 5** – Valores de alteração da frequência cardíaca (FC) mediante administração de atenolol e metil-atropina dos animais dos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), captopril (CPT) e monocrotalina captopril (MCT-CPT). B: valor de FC ao nível basal, (A) valor de FC após atenolol, (A+M) valor de FC após atenolol + metil-atropina. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.

**Figura 6** – Valores da Bradicardia Reflexa Máxima (A), Taquicardia Reflexa Máxima (B), e dos Ganhos em resposta à fenilefrina (C) e em resposta ao nitroprussiato de sódio (D) dos grupos CON, MCT, CPT e MCT-CPT. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.

**Figura 7** – Variações da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), (Painel A) e da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) (Painel B) em resposta às seguintes doses de KCN: 10, 20, 40 e 80  $\mu$ g/0,05mL dos grupos CON, MCT, CPT e MCT-CPT. \*\* $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT.  $^{\dagger}p < 0,05$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CPT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.

**Figura 8** – Variações percentuais da pressão arterial média (PAM) (painel A) e da frequência cardíaca (FC) (painel B) em resposta às diferentes doses de FBG: 1,5µg/Kg, 3µg/Kg, 6µg/Kg, 12µg/Kg e 24µg/Kg, e ganho médio (painel C) dos grupos CON, MCT, CPT e MCT-CPT. \* $p < 0,05$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT. † $p < 0,05$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CPT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher. # $p < 0,05$ .

**Figura 9** – Valores da espessura da parede muscular em porcentagem (A) e do lúmen arteriolar em porcentagem (B) dos grupos CON, MCT, CPT e MCT-CPT. \*\* $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.

**Figura 10** – Visualização da hipertrofia da camada média dos ramos musculares da artéria pulmonar junto a bronquíolos, em ratos tratados com dose única (60 mg/kg) de MCT e eutanasiados três semanas após o tratamento, e redução da hipertrofia após o tratamento com captopril (grupo MCT-CPT), tornando a espessura da parede semelhante à observada no grupo CON. (Coloração: hematoxilina e eosina).

## LISTA DE ABREVIACÕES

All – Angiotensina II

AIII – Angiotensina III

BNP – Peptídeo natriurético do tipo B

bpm – Batimentos por minuto

COX – Ciclo-oxigenase

cpm – Ciclos por minuto

DHM – Dihidro-monocrotalina

dP/dT(-) – Derivada de pressão sobre o tempo negativa

dP/dT(+) – Derivada de pressão sobre o tempo positiva

ECA – Enzima conversora de angiotensina

ET-1 – Endotelina-1

FBG – Fenilbiguanida

FC – Frequência cardíaca

FR – Frequência respiratória

HAP – Hipertensão arterial pulmonar

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

HCL – Ácido clorídrico

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> – Íon bicarbonato

HE – hematoxilina/eosina

HP – Hipertensão pulmonar

IECA – Inibidores da enzima conversora de angiotensina

IRAP – *Insulin-regulated amino-peptidase*

KCN – Cianeto de potássio

MCT – Monocrotalina

mmHg – Milímetros de mercúrio

NA – Núcleo ambíguo

NO – Óxido nítrico

NTS – Núcleo do trato solitário

OMS – Organização mundial de saúde

PA – Pressão arterial

$P_aCO_2$  – Pressão parcial de dióxido de carbono

PAD – Pressão arterial diastólica

PAM – Pressão arterial média

$P_aO_2$  - Pressão parcial de oxigênio

PAPM – Pressão arterial pulmonar média

PAS – Pressão arterial sistólica

PDF – Pressão diastólica final

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PDI – Pressão diastólica inicial

PGI – Prostaciclina

pH – Potencial hidrogeniônico

PP – Pressão arterial de pulso

PSmax – Pressão sistólica máxima

PSVD – Pressão sistólica do ventrículo direito

PSVE – Pressão sistólica do ventrículo esquerdo

RBJ – Reflexo Bezold-Jarisch

SaO<sub>2</sub> – Saturação de hemoglobina

SNA – Sistema nervoso autônomo

SNC – Sistema nervoso central

SNS – Sistema nervoso simpático

SRA – Sistema renina-angiotensina

TGF- $\beta$  – Fator  $\beta$  de crescimento celular

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

V<sub>A</sub> – Ventilação alveolar

VC – Volume corrente

VD – Ventrículo direito

VE – Ventrículo esquerdo

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

Vmin – Volume minuto

## **RESUMO**

## RESUMO

**Introdução:** A Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) é uma doença caracterizada pelo aumento da resistência arteriolar nos pulmões. Como consequência das alterações arteriolares, ocorre hipóxia que leva à ativação de alguns mecanismos, incluindo os reflexos neurais, respostas ventilatórias e autonômicas, porém estes mecanismos não foram totalmente esclarecidos. Este estudo teve como objetivo avaliar como esses mecanismos são afetados pela HAP induzida pela monocrotalina (MCT) e o possível papel terapêutico do inibidor da enzima conversora da angiotensina (IECA), captopril, na reversão deste processo de remodelamento.

**Métodos e Resultados:** Grupos de ratos *Wistar* foram tratados com uma injeção subcutânea de MCT ( $60 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) para indução da HAP. Três semanas depois, estes animais receberam captopril (CPT,  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) na sua água de beber (grupo MCT-CPT) ou apenas água (grupo MCT) durante 2 semanas. Como controle, outro grupo de animais foram tratados com solução salina e receberam captopril na água de beber (grupo CPT) ou água pura (grupo CON), também durante 2 semanas. Os resultados mostraram que a HAP foi totalmente induzida no grupo MCT, evidenciada por uma elevação do índice pulmonar. A análise gasométrica e respiratória evidenciaram a ocorrência de hipoxemia e hiperventilação compensatória. O tratamento com captopril dos animais com HAP normalizou estes parâmetros em comparação com o grupo CON. Observou-se também uma significativa disfunção autonômica no grupo MCT, a qual foi revertida após o tratamento com captopril. Finalmente, as análises dos reflexos cardiovasculares evidenciaram uma exacerbação das respostas do quimiorreflexo no grupo MCT, enquanto a



sensibilidade do barorreflexo e do reflexo Bezold-Jarisch reduziu expressivamente. Surpreendentemente, o tratamento com captopril normalizou essas respostas reflexas a valores semelhantes ao grupo CON.

**Conclusões:** O presente estudo demonstrou que a HAP induzida por MCT induz respostas respiratórias compensatórias, disautonomia, disfunção do barorreflexo e do reflexo Bezold-Jarisch e exacerbação das respostas quimiorreflexas. Os dados também indicam que o tratamento com captopril foi eficaz em reverter estes distúrbios cardio-respiratórios, sugerindo que o uso de drogas ACEI pode ter um grande potencial terapêutico para a HAP.

**Palavras-chave:** hipertensão arterial pulmonar, monocrotalina, captopril, quimiorreflexo, barorreflexo, reflexo Bezold-Jarisch.

## **ABSTRACT**

## ABSTRACT

**Background:** Pulmonary Arterial Hypertension (PAH) is a disease associated with increased arteriolar resistance in the lungs. Due to hypoxemia, some physiological mechanisms can be posteriorly affected, including respiratory and cardiovascular reflexes, but this has not yet been fully investigated. This study aimed to evaluate how these mechanisms were affected by monocrotaline (MCT)-induced PAH and the possible therapeutic role of angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEi), captopril, in reversing this remodeling process.

**Methods and Results:** Groups of wistar rats received MCT injections ( $60 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Three weeks later, they received captopril (CPT,  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) in their drinking water (MCT+CPT) or water alone (MCT) for 2 weeks. As control, saline-treated animals received CPT in their drinking water (CPT) or water alone (CON), also for 2 weeks. Results showed that PAH was fully induced in the MCT group, evidenced by a high pulmonary index. Gasometrical and respiratory analyses showed hypoxemia and compensatory hyperventilation. CPT treatment brought these parameters to similar values to those observed in the CON group. We observed that autonomic dysfunction in the MCT group was suppressed by CPT. Finally, cardiovascular reflexes analysis showed increased chemoreflex responses in the MCT group, while baroreflex and *Bezold-Jarisch* reflex sensibility was decreased. Surprisingly, CPT normalized these reflex responses to values similar to the CON group.

**Conclusions:** The present study demonstrates that MCT-induced PAH induces compensatory respiratory responses, dysautonomia, baroreflex and *Bezold-*

*Jarisch* reflex dysfunction and increases chemoreflex responses. The data also indicate that CPT was effective in reversing these cardio-respiratory disorders, suggesting that ACEI could be a potential therapeutic target for PAH.

**Key words:** pulmonary arterial hypertension, monocrotaline, captopril, chemoreflex, Baroreflex, Bezold-Jarisch reflex.

## **INTRODUÇÃO**

## INTRODUÇÃO

A hipertensão pulmonar (HP) é uma doença multifatorial que apresenta diferentes manifestações e, conseqüentemente, diferentes mecanismos patogênicos que levam ao aumento da pressão arterial pulmonar média (PAPM). Por consenso, o valor mínimo da PAPM para ser considerada como HP deve ser igual ou superior a 25 mmHg em repouso determinada através de cateterismo cardíaco direito (Faber e Loscalzo, 2004; Simonneau et al., 2009; Reis et al., 2010).

Considera-se como valor normal de PAPM em repouso  $14 \pm 3$  mmHg e o limite superior normal de 20,6 mmHg (Reis et al., 2010). O aumento da PAPM acima dos valores de normalidade ocorre devido ao aumento da resistência vascular pulmonar em indivíduos que apresentam a seguinte combinação de fatores: vasoconstrição, remodelamento da parede vascular arterial pulmonar e trombose *in situ* (Rubin, 1997).

Historicamente, a classificação da HP passou por diversas reformulações<sup>1</sup>, sendo a mais utilizada atualmente criada em 2003, no 3º Simpósio Mundial de HP (McLaughlin e McGoon, 2006). A saber: 1- Hipertensão arterial pulmonar (HAP), 2- HP devido a doença do coração esquerdo, 3- HP devido a doenças pulmonares e/ou hipóxia, 4- HP tromboembólica crônica e 5- HP com mecanismos multifatoriais desconhecidos (Anexo 1).

Dentre as diferentes formas de apresentação de HP, aquela que induz a doença através de mecanismos que afetam diretamente a vasculatura pulmonar tem

---

<sup>1</sup>Originalmente, em 1973, a HP era classificada apenas em Primária e Secundária. Entretanto, os estudos demonstraram que os pacientes com HP apresentavam especificidades, sendo então a classificação reformulada em 2003 na Itália, e atualizada em dois eventos científicos posteriores: 3º Simpósio Mundial de HP (Dana Point – EUA / 2008) e 5º Simpósio Mundial (Evian – França / 2013).

despertado o nosso interesse. De acordo com a última classificação da HP, esta se refere ao primeiro sub-grupo, isto é, a hipertensão arterial pulmonar (HAP).

Nas últimas duas décadas, observou-se um aumento significativo da taxa de sobrevida da HAP, o que provavelmente está relacionado com o avanço dos métodos de diagnóstico, bem como das terapias farmacológicas. Entretanto, uma vez que os tratamentos têm caráter apenas paliativo e não curativo, esta doença continua apresentando um prognóstico ruim, com taxa de mortalidade de 50% dos pacientes sete anos após o diagnóstico (Benza et al., 2012).

Em 1998, Gaine e Rubin descreveram que a prevalência mundial da HAP era aproximadamente de 1 a 2 casos por 1 milhão de pessoas na população geral. Entretanto, embora não exista na literatura uma estimativa mundial atualizada, registros franceses mais recentes sugerem que a prevalência de HAP seja por volta de 15 indivíduos por 1 milhão de habitantes. Estes registros descrevem também que a HAP idiopática é a forma mais prevalente, sendo mais frequente no sexo feminino. (Humbert et al., 2006).

Sabe-se que a mortalidade dos pacientes com HAP tem forte associação tanto com a severidade dos sintomas como com a falência ventricular direita, sendo que nos últimos anos muitos fatores vêm sendo descritos na literatura como preditores de mau prognóstico na HAP, dentre os quais podemos citar: idade avançada, maior severidade no sexo masculino (Kane et al., 2011), classe funcional avançada (III e IV), redução da capacidade de exercício medida pelo teste de caminhada de 6 minutos ou pelo teste de esforço cardiopulmonar, aumento da pressão de átrio direito, disfunção ventricular direita significativa, baixo débito cardíaco, elevação dos níveis de peptídeo natriurético cerebral e presença de diagnóstico subjacente de esclerodermia (McLaughlin et al., 2009).

Nas últimas décadas, o estudo da HAP tem avançado de forma expressiva tanto em humanos como em modelos animais. Dentre os modelos experimentais para o estudo da HAP propostos pela literatura, os mais comumente utilizados são a indução da doença através da exposição à hipóxia crônica (Stenmark et al., 2009) e a indução da HAP via monocrotalina (MCT) (Wilson et al., 1992; Brown et al., 1998; Ishikawa et al., 2009). O modelo de MCT é utilizado frequentemente para o estudo da HAP por ter como vantagens o fato de ser tecnicamente simples, reprodutível e de baixo custo em comparação com outros modelos (Gomez-Arroyo et al., 2012).

A MCT é um alcalóide inativo obtido das sementes da *Crotalaria spectabilis* sendo transformado no fígado em um alcalóide tóxico, o pirrol da MCT (Yuyama et al., 2004). Apesar da resposta à MCT variar entre espécies de animais devido às diferenças existentes do metabolismo hepático pelo citocromo p-450, a espécie mais utilizada para estudar a HAP induzida por MCT é o rato (Stenmark et al., 2009). Vários trabalhos mostraram que uma única injeção subcutânea ou intraperitoneal de MCT em ratos, provoca lesões na vasculatura pulmonar que resulta em HAP e hipertrofia do VD (Morita et al., 1996; Nakazawa, et al., 1999; Ito et al., 2000; Gomez-Arroyo et al., 2012).

Entretanto, apesar deste modelo experimental ser utilizado desde 1961 (Wilson et al., 1992), o mecanismo exato pelo qual a MCT provoca a HAP ainda é desconhecido. Sugere-se que a MCT promova uma lesão endotelial vascular direta (Jasmin et al., 2001), megalocitose das células endoteliais da artéria pulmonar (Lee et al., 2009) e inflamação dos vasos pulmonares (Farhat et al., 1993), levando a um aumento da resistência arterial pulmonar e hipertrofia de VD (Gomez-Arroyo et al., 2012). As lesões vasculares pulmonares induzidas pela MCT são semelhantes às aquelas observadas na HAP em humanos, sugerindo que a HAP deste modelo pode



representar uma das melhores formas de avaliar a correlação entre disfunção endotelial e hipertrofia/falência do VD (Palevsky et al., 1989), assim como a descoberta de novas terapias medicamentosas.

Quanto aos mecanismos patogênicos, uma característica que precede o quadro de HAP é a lesão endotelial da parede das arteríolas pulmonares, que está associada a uma constrição ocasionada pelo predomínio dos fatores constritores em detrimento dos fatores relaxantes do endotélio (Puri et al., 2007; Archer e Michelakis, 2009). O desequilíbrio entre os fatores relaxantes e constritores do endotélio induz a um remodelamento vascular que é caracterizado por lesões plexiformes, hipertrofia da camada média vascular, fibrose laminar do tipo concêntrico da camada íntima, degeneração fibróide e lesões trombóticas que culminam com o aumento da PAPM (Runo e Loyd, 2003).

Sabe-se que o endotélio vascular possui um importante papel na fisiopatogenia da HAP devido à relevância de seu envolvimento no processo vaso-oclusivo propriamente dito (Larumbe e Escoboza, 1994). As células endoteliais podem responder de diferentes maneiras às diversas injúrias, como hipóxia, estresse de cisalhamento, inflamação, toxinas ou drogas, resultando em proliferação endotelial anormal e posteriormente na formação de lesões plexiformes (Cool et al., 1999).

Em relação à hipóxia, apesar desta não ser um dos principais fatores para o desenvolvimento inicial da HAP, ela pode contribuir significativamente para o remodelamento vascular pulmonar durante a progressão da doença (hipóxia crônica) e/ou causar vasoconstrição pulmonar importante (hipóxia aguda) (Hardingham et al., 1997; Sweeney e Yuan, 2000) e aumentos da pressão arterial (PA) no leito pulmonar (Le Cras et al., 1998). Além disso, sabe-se que a hipóxia estimula a liberação de um

potente polipeptídeo vasoconstritor pelas células endoteliais, a endotelina-1 (ET-1), que se liga a receptores específicos nas células musculares lisas vasculares, o que resulta no aumento da concentração de cálcio intracelular levando à vasoconstrição. Estes dois mecanismos (vasoconstrição arterial pulmonar e liberação de ET-1) relacionados à hipóxia culminam com a elevação da resistência vascular pulmonar e agravamento do quadro de HAP (Pigazzi et al., 1999).

Entretanto, uma vez que existem vários mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogenia da HAP, não é possível imaginar o mesmo mecanismo para explicar a vasoconstrição e o remodelamento vascular em todas as formas de HP. Além disso, mesmo se considerarmos uma única forma de doença, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos podem variar de acordo com a fase evolutiva (Rubin et al., 2004).

Por outro lado, a presença de hipóxia na HAP, além de ser uma resposta que ocorre como consequência da doença em si, pode causar a ativação de mecanismos reflexos neurais que afetam diretamente não só o sistema respiratório como também o cardiovascular e o autonômico. Contudo, não existem estudos que demonstrem se estas respostas atenuam ou agravam a HAP, sendo que estes aspectos da doença permanecem por ser esclarecidos.

Em relação ao quimiorreflexo, o aumento da sua atividade na HAP pode ser consequente às possíveis alterações ventilatórias e o prejuízo na troca gasosa, uma vez que se sabe que a ocorrência da hipóxia e a sua manutenção, bem como a hipercapnia e a redução do pH, levam a ativação de quimiorreceptores periféricos localizados nos corpúsculos carotídeos de ratos (Sapru e Krieger, 1977), promovendo hiperatividade simpática, com consequente inotropismo positivo e aumento da resistência vascular periférica (Marshall et al, 2000; Haibara et al, 2002).

Em adição, existem quimiorreceptores centrais que podem ser ativados principalmente em situações de hipercapnia (Marshall, 1987). Este conjunto de respostas às alterações descritas é denominado quimiorreflexo.

De acordo com Marcus et al. (2010), a circulação pulmonar é rica em terminações nervosas simpáticas, as quais parecem desempenhar um papel importante no crescimento e diferenciação vascular através de mecanismos não totalmente esclarecidos. Estes autores demonstraram que ocorre uma hiperatividade destas terminações nervosas em doentes com HAP avançada, a qual provavelmente é parcialmente mediada pelo quimiorreflexo, visto que a submissão dos pacientes a condição de hiperóxia para inativação do quimiorreflexo, ocasiona a redução da atividade destas terminações.

Não obstante à ativação quimiorreflexa, as alterações vasculares e parenquimatosas presentes em modelos experimentais de HAP parecem ter um impacto funcional direto sobre as trocas gasosas. Em relação às alterações ventilatórias, existem algumas descrições sucintas e pouco objetivas de taquipnéia em ratos tratados com MCT (Nihei et al., 2005; Brown et al., 1998). Quanto ao impacto desta doença nas trocas gasosas. Estudos de Lai et al. (1996) descreveram uma redução na capacidade de difusão do monóxido de carbono 2 a 3 semanas após a injeção de MCT. Estudos de Schermuly et al. (2004) e Dumitrascu et al. (2008) por sua vez mostraram uma redução da  $PaO_2$  em amostras do sangue arterial de ratos tratados com MCT. Assim, os mecanismos ventilatórios permanecem por serem elucidados na HAP, principalmente sobre suas implicações sobre o sistema cardiovascular.

Em relação às respostas hemodinâmicas na HAP, uma vez que a o processo de remodelamento vascular e a vasoconstrição pulmonar induzida por

diferentes mecanismos culminam com a elevação da resistência vascular pulmonar, esta elevação tem como uma das consequências o aumento da pós-carga ventricular direita, o que gera adaptações hemodinâmicas nesta câmara cardíaca, tais como o aumento da pressão sistólica do VD e a hipertrofia ventricular direita (Chen et al., 1998; Szabo et al., 2006). Com a hipertrofia do VD, ocorre aumento da demanda miocárdica de oxigênio e redução da perfusão do VD, comprometendo ainda mais a contratilidade (Bogaard et al., 2009). Embora o ventrículo esquerdo (VE) não seja diretamente comprometido, a progressiva dilatação do VD pode prejudicar seu desempenho devido às interações com o septo interventricular (Louie et al., 1995; Nootens et al., 1995).

Uma das consequências das alterações hemodinâmicas desenvolvidas na HAP é a ativação neuro-humoral do sistema renina angiotensina (SRA) e do sistema nervoso simpático (SNS), o que possivelmente acelera o processo de remodelamento vascular pulmonar e influencia negativamente a evolução da doença em longo prazo (Man et al., 2012). Em adição, de acordo com Chassagne et al. (2000), a muscularização vascular observada em animais submetidos a hipóxia está associada a uma super-expressão dos receptores AT1 e AT2 da angiotensina II (AII), sugerindo que a AII tem um papel importante nas alterações estruturais e hemodinâmicas durante o desenvolvimento da HP hipóxica.

Quanto ao tratamento da HAP em humanos, vários fármacos vêm sendo utilizados. Entretanto, apesar das alternativas terapêuticas, a HAP continua sendo uma doença progressiva, crônica e incurável, uma vez que até o momento não existe uma droga que seja completamente eficaz na reversão dos efeitos deletérios da doença. Nos últimos dez anos verificou-se uma grande evolução na compreensão dos mecanismos da lesão vascular pulmonar e da descoberta de

fármacos que vieram permitir a melhoria significativa do prognóstico da doença. A terapêutica disponível atualmente para o tratamento da HAP resulta em 2 grupos distintos de fármacos: os inibidores de canais de cálcio e os fármacos vasoativos específicos (Reis et al., 2010).

O tratamento à longo prazo com inibidores de canais de cálcio parece ser eficaz apenas em um pequeno grupo de pacientes. Dentre os fármacos vasoativos utilizados, estão os prostanóides (Sitbon et al., 2002), os antagonistas dos receptores de ET1 (Rubin et al., 2002; Barst et al., 2003), os inibidores da 5' fosfodiesterase (Galié et al., 2005) e o óxido nítrico inalatório (Barman et al., 2009).

Entretanto, o tratamento da HAP com estes fármacos muitas vezes apresentam efeitos colaterais importantes. Atualmente, um dos maiores desafios no tratamento da HAP é a descoberta de agentes terapêuticos eficazes que consigam tratar a vasculatura pulmonar sem efeitos adversos sistêmicos significativos.

Apesar das evidências de exacerbação do SRA na HAP, tais como a super-expressão dos receptores AT1 no coração de animais submetidos à hipóxia crônica (Marshall, 2003; Bader, 2010) e o aumento da expressão de All em animais com HAP (Marshall, 2003), os fármacos vasoativos denominados inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) não são drogas rotineiramente utilizadas no tratamento da HAP. Estudos de Morrel et al. (1995), mostraram em animais que sofrem de hipóxia crônica em associação com HAP, um aumento dramático da concentração da ECA nas arteríolas pulmonares, tornando-as mais muscularizadas.

A All é a substância ativa mais importante do SRA, tendo grande papel regulador de fluídos e controlador do balanço de sódio, assim como no crescimento e remodelamento cardiovascular. Possui também efeitos diretos e indiretos nos rins, através da estimulação da síntese de aldosterona pela glândula adrenal e interações

com o sistema nervoso central (SNC) incluindo estímulos para ingestão de água, apetite ao sal e liberação do hormônio antidiurético vasopressina, além de modular a regulação autonômica da função cardiovascular (Peach et al., 1977; Saavedra, 1992; Wright e Harding, 1992).

Além da AII, seus metabólitos também são responsáveis por algumas ações específicas (vide Anexo II). A angiotensina III (AIII), gerada a partir da AII, é também causadora de vasoconstrição, liberação de aldosterona e remodelamento vascular (Zini et al., 1996). A angiotensina IV é gerada através da angiotensina III, e tem ações mediadas pelo receptor IRAP (*insulin-regulated amino-peptidase*), tais como a vasodilatação renal e a regulação das funções cognitivas, além de participar da síntese de enzimas aminopeptidase N, que atua no processo de angiogenese através da promoção do crescimento e proliferação de células vasculares (Ruiz-Ortega et al., 2007).

A angiotensina 1-7 é considerada atualmente um componente ativo do SRA, podendo ser gerada a partir da Angiotensina I por uma via independente da ECA. Estudos recentes propuseram que a Angiotensina 1-7 pode mediar alguns dos efeitos do tratamento com inibidores de ECA. A inibição da ECA aumenta os níveis plasmáticos de Angiotensina 1-7 (Ferrario et al., 1997; Roks et al., 1999). O estudo de Roks et al. (1999), mostrou que a Angiotensina 1-7 antagoniza a vasoconstrição induzida pela A II em artérias de seres humanos e inibe a ECA plasmática, cardíaca e vascular, sugerindo que a Angiotensina 1-7 seria um modulador do SRA cardiovascular em humanos.

Além dos efeitos sistêmicos, o SRA parece ter grande influência na vasculatura pulmonar. O efeito vasoconstritor pulmonar da AII foi descrito desde 1961 nos estudos de Segel et al., sendo que Lipworth et al. (1994) mostraram que o

aumento da resistência vascular pela All é significativamente mais pronunciado ao nível pulmonar do que sistemicamente, sugerindo que o leito pulmonar responde mais intensamente aos efeitos vasoconstritores da All. Estudos de Morrel et al. (1995), mostraram que ratos submetidos à hipóxia crônica apresentam um aumento da expressão da ECA pulmonar.

Assim, uma vez que a All participa do processo de hipertrofia da musculatura lisa vascular e do aumento da proliferação celular através da estimulação de fatores de crescimento, tais como o fator  $\beta$  de crescimento celular (TGF-  $\beta$ ), e a hipóxia crônica causa um aumento da expressão da ECA pulmonar (Puri et al., 2007), acreditamos que o uso dos IECA no tratamento da HAP poderia ser uma alternativa terapêutica potencial.

Em relação às respostas sistêmicas observadas na HAP, ao considerarmos o envolvimento do quimiorreflexo nesta doença, temos que considerar a possível participação de outros mecanismos reflexos de controle da pressão arterial (PA), tal como o barorreflexo e o reflexo Bezold-Jarisch. Pouco se sabe sobre o papel destes reflexos nesta doença e/ou suas possíveis disfunções.

O principal mecanismo de controle a curto prazo da PA é desempenhado pelos reflexos cardiovasculares que são originados nos barorreceptores arteriais e nos receptores de estiramento da região cardiopulmonar (Shepherd e Mancia, 1986). Os ajustes reflexos ocorrem principalmente através da ativação dos barorreceptores aórticos e carotídeos que transmitem informações ao SNC. As aferências provenientes dos barorreceptores arteriais dirigem-se para o SNC, e deste partem eferências autonômicas para o coração e vasos sanguíneos, constituindo-se em um mecanismo de retroalimentação, que permite a regulação da PA batimento a batimento (Jacob e cols., 1986, 1988).

Dentre os mecanismos neurais de regulação da PA, o barorreflexo é o mais estudado (Irigoyen e Krieger, 1998, Henry et al., 1998, Creager e Creager, 1994, Mortara et al., 1997). Tal reflexo promove sua ação por meio de mecanorreceptores localizados na camada adventícia do arco aórtico e do seio carotídeo (Kunze, 1984). Estes receptores são sensíveis às alterações de tensão produzidas na parede dos vasos pelas ondas de pressão sistólica ou por elevações súbitas da PA (Brown, 1980; Spyer, 1990). A ativação destes receptores gera potenciais de ação, os quais são transmitidos para o SNC por meio de aferências barorreceptoras que caminham juntamente com os nervos vago e glossofaríngeo. Quando ocorre um aumento súbito de PA, a consequente ativação do barorreflexo promove simultaneamente uma elevação da atividade parassimpática ao coração e uma diminuição da atividade simpática, tanto para os vasos de resistência, quanto para o coração (Spyer, 1990). Isso resulta em bradicardia, redução da contratilidade cardíaca, redução da resistência vascular periférica e consequentemente, uma diminuição do débito cardíaco e da PA. Em contrapartida, a queda de PA é compensada por um decréscimo na descarga aferente barorreceptora, promovendo alterações exatamente opostas às acima citadas para o componente autonômico (Brown, 1980; Michelini, 1989).

Sabendo-se que a AII participa do controle da PA tanto através de seus efeitos diretos no tônus vascular como através de sua ação no SNS, é razoável supor que o tratamento de animais com HAP com drogas inibidoras da ECA possa reduzir ou talvez impedir a evolução da doença bem como suas consequências nos diversos sistemas orgânicos.

Outro reflexo cardiovascular que desempenha importante função no controle da PA é o Reflexo Bezold-Jarisch (RBJ), um epônimo para a tríade de respostas



cardiorrespiratórias (apnéia, bradicardia e hipotensão). Esta tríade é mediada por núcleos localizados no tronco cerebral que controlam a respiração, frequência cardíaca e o tônus vasomotor, a partir de informações transmitidas através de aferentes vagais cardíacos (Aviado e Aviado, 2001). Este reflexo possui receptores localizados em diferentes estruturas cardiopulmonares, incluindo átrios, ventrículos, vasos e parênquima pulmonares (Kappagoda et al., 1972; Thorén, 1980). A maior concentração destes receptores se encontra no ventrículo esquerdo (VE), principalmente na parede ínfero-posterior (Mark et al., 1983).

Uma vez que, de acordo com Mark (1983) a atividade do RBJ é influenciada pela atividade do sistema nervoso autônomo, sistema este que se encontra com a atividade alterada na HAP (Velez-Roa et al., 2004), possivelmente a atividade deste reflexo pode estar modificada em ratos tratados com MCT. Entretanto, não existem estudos que discutam o papel do RBJ na HAP, sendo o presente estudo o primeiro a realizar tal investigação.

A extensa quantidade de estudos disponíveis na literatura sobre os reflexos cardiovasculares demonstra a importância destes mecanismos neurais sobre a regulação da PA, tanto em condições fisiológicas como nas variadas formas de hipertensão experimental e clínica. No entanto, não há disponível na literatura estudos que tenham avaliado a função e correlação destes mecanismos reflexos neurais em animais com HAP, e não sabemos se o tratamento com captopril é capaz de normalizar estes mecanismos. Assim, uma vez que o SRA está envolvido no desenvolvimento da HAP, acreditamos que a investigação das respostas respiratórias e cardiovasculares tônicas e reflexas associadas ao tratamento com fármacos que inibem o SRA seja de grande valia para maior entendimento da HAP e mecanismos envolvidos, bem como para a busca de novas alternativas terapêuticas

para o manejo da HAP, visto que até o momento esta doença permanece incurável, altamente incapacitante e com alta morbi-mortalidade associadas.

## **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

### Geral:

- Avaliar os efeitos promovidos pela HAP induzida pela MCT sobre os mecanismos de regulação reflexa da pressão arterial em ratos *Wistar* submetidos ao tratamento com o inibidor da enzima conversora de angiotensina, captopril.

### Específicos:

- Comparar os efeitos cardiovasculares, autonômicos e respiratórios promovidos pela HAP induzida pela MCT em ratos *Wistar*.
- Avaliar os efeitos do tratamento com captopril em ratos *Wistar* portadores de HAP induzida pela MCT sobre os sistemas cardiovascular, autonômico e respiratório.
- Estudar as alterações anatomopatológicas da vasculatura pulmonar de ratos *Wistar* portadores de induzida pela MCT submetidos ao tratamento com captopril.
- Avaliar as respostas cardiovasculares reflexas (Baroreflexo, Quimiorreflexo e RBJ) em ratos *Wistar* portadores de HAP induzida pela MCT submetidos ao tratamento com captopril.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.0 – Animais experimentais

Para a realização dos protocolos experimentais foram utilizados ratos *Wistar*, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo com peso padronizado entre 180-200g. Em todos os protocolos experimentais os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, com controle de claro/escuro (12/12 h) e temperatura (20 – 22°C), com livre acesso à água e ração balanceada (Probiotério Primor S/A, São Paulo). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas para pesquisa biomédica que determinam os cuidados para o uso do animal de laboratório em ensaios experimentais, como indicado pela Federação das Sociedades de Biologia Experimental. O protocolo desta pesquisa foi aprovado em reunião ordinária do Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA-UFES) no dia 13/04/2012.

### 2.0 – Grupos experimentais

Os animais utilizados neste estudo foram divididos em 4 grupos experimentais, sendo estes:

- Wistar controle (CON, n=18);
- Wistar tratado com MCT (MCT, n=18);
- Wistar tratados com Captopril (CPT, n=18);
- Wistar tratados com Captopril e MCT (MCT-CPT, n=18);

### **3.0 – Anestesia**

No presente estudo, foi utilizado o anestésico pentobarbital sódico na dose de 50 mg/kg, administrado via intraperitoneal para permitir as cirurgias de cateterização da artéria e veia femorais bem como a cateterização das câmaras cardíacas.

### **4.0 – Tratamento dos animais para indução da HAP**

A HAP foi induzida através de uma única aplicação de MCT (Crotaline; Sigma Chemical Co), injetada de forma subcutânea, na dose de 60 mg/Kg. A MCT foi inicialmente dissolvida em 1 N de ácido clorídrico (HCL). Após, o pH foi corrigido para 7,4 com solução de NaOH 0.5 N. Uma vez dissolvido, o volume da solução foi ajustado para 7 mL com salina.

### **5.0 – Tratamento com captopril**

Após 3 semanas da aplicação de MCT, os animais foram submetidos ao tratamento crônico com captopril na dose de 100 mg/Kg administrado na água de beber por 2 semanas *ad libitum*. O cálculo da dosagem foi realizado considerando que os animais ingeriam aproximadamente 40 mL/dia. A dose de captopril escolhida baseou-se no estudo experimental de Bolterman et al. (2005).

Os animais do grupo controle que foram tratados com este fármaco receberam as mesmas doses e realizaram o tratamento também por 2 semanas. O captopril foi utilizado a fim de inibir a ECA.

## **6.0 – Cateterização da artéria e veia femoral**

Sob anestesia por pentobarbital sódico, os animais foram submetidos ao implante de um cateter na aorta abdominal, acessada através da artéria femoral esquerda, para permitir os registros cardiovasculares. Também foi inserido um cateter na veia cava inferior através da veia femoral, para administração de drogas, de acordo com cada protocolo experimental. As extremidades livres foram direcionadas, sob a pele no dorso do animal, por meio de um trocáter, até a região médio-cervical posterior, onde, por meio de uma nova incisão, os cateteres foram exteriorizados e fixados por meio de fio de sutura. Para cateterização, foram utilizadas cânulas de polietileno, com duas partes soldadas entre si: PE-50 (CPL Medical's – São Paulo, Brasil) + PE-10 (Portex, USA). Estas ficaram preenchidas com solução fisiológica (0,9%) previamente a cateterização. Após a cirurgia, os animais foram alocados em caixas individuais, para permitir sua recuperação com água e ração *ad libitum*.

## **7.0 – Registro direto da pressão arterial e da frequência cardíaca**

Como medida preventiva, antes do início dos registros da PA e da FC, os cateteres arteriais foram heparinizados (Liquemine, Roche, Rio de Janeiro, Brasil) (1:50) para evitar a formação de coágulos durante o período de registros.

Para os registros da Pressão Arterial Pulsátil (PP), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC), o cateter foi conectado a um transdutor de pressão conectado a um Sistema de Aquisição de Dados computadorizado (PowerLab) acoplado a um computador. A frequência de amostragem ficou fixada



em 100 Hz. Para visualização dos registros e análise dos dados foi utilizado o software Chart V4.2 (PowerLab® ADInstruments, USA).

## **8.0 – Registro das pressões das câmaras cardíacas**

Para os registros das pressões ventriculares e atriais, os animais foram submetidos ao implante de um tubo de polietileno (PE-50) através da artéria carótida direita para acessar o VE e permitir os registros de pressão sistólica máxima (PS<sub>máx</sub>), pressão diastólica final (PDF), derivada de pressão sobre o tempo positiva  $dP/dT(+)$  e derivada de pressão sobre o tempo negativa  $dP/dT(-)$ . Também com o auxílio de uma PE-50, a veia jugular direita foi cateterizada para permitir o registro da pressão ventricular direita. Foram registradas as mesmas pressões descritas para o VE, isto é, PS<sub>máx</sub>, PDF,  $dP/dT(+)$  e  $dP/dT(-)$ . Para os registros de pressões intracardíacas ventriculares, a cânula foi conectada a um sistema de aquisição de dados biológicos (Power Lab) acoplado a um computador como uma frequência de amostragem de 1000 Hz.

## **9.0 - Registro pletismográfico de corpo inteiro**

Antes da realização das medidas cardiovasculares, foram realizados os registros pletismográficos. O animal foi colocado em uma câmara pletismográfica acrílica, transparente, hermeticamente fechada, com volume de 2.095 ml. Esta câmara foi conectada a um transdutor de alta sensibilidade (modelo 270 – medical group HEWLETT PACKARD RANGE 4002° 1734 AO2988) conectado a um polígrafo de 4 canais (HEWLETT PACKARD 7754B SYSTEM) acoplado a um sistema computadorizado de registros (BIOPAC), para permitir os registros das variações de

volume dentro da câmara, bem como da frequência respiratória. A calibração do sistema foi feita através de uma seringa de 1 ml conectada à câmara pletismográfica, onde injeções de 0,1 e 0,2 ml foram feitas com o objetivo de se registrar as alterações de pressão dentro da câmara, as quais foram utilizadas nos cálculos dos volumes respiratórios.

A cânula arterial do animal foi exteriorizada da câmara através de um orifício na parede superior da mesma, a qual permaneceu preenchida com vaselina para assegurar o isolamento da mesma. Tanto a cânula arterial como a câmara pletismográfica foram conectadas ao polígrafo HEWLETT PACKARD e ao sistema de aquisição de dados BIOPAC, para permitir o registro simultâneo da PAP (sistólica e diastólica) e da ventilação. Após um período de aproximadamente 15 a 20 minutos para a adaptação do animal à câmara pletismográfica, foram iniciados os registros. Foram realizados 5 períodos de registros por animal, sendo que cada um teve a duração de 5 minutos. Entre estes períodos de registros, a câmara foi aberta e assim permaneceu por 1 minuto, para permitir a renovação do ar da câmara. Para as análises dos dados não foi utilizado o primeiro período de registro, uma vez que neste, o animal encontrava-se em fase de adaptação à câmara.



**Figura 1:** Fotografia ilustrando o sistema de registro respiratório: câmara pletismográfica de corpo inteiro.

## 10.0 – Cálculos dos Valores Ventilatórios

Para a quantificação dos volumes respiratórios, vários parâmetros foram considerados, de acordo com a seguinte equação:

$$V_C = V_K \cdot \frac{\Delta P_T}{\Delta P_K} \cdot \frac{T^0_C}{T^0_a} \cdot \frac{P_b - P_{CH_2O}}{(P_b - P_{CH_2O}) - \frac{T^0_C \cdot (P_b - P_{PH_2O})}{T^0_P}}$$

Onde:

$V_C$  = volume de ar corrente (unidade = ml).

$V_K$  = volume de ar injetado na câmara através da seringa de calibração (0,1; 0,2 ml; etc.).

$\Delta P_T$  = variação de pressão dentro da câmara, na presença do animal. Este valor foi obtido a partir dos registros gráficos e corresponde a um valor em centímetros de uma inspiração ou expiração. Para determinação deste, foi selecionado um segmento do registro onde o animal encontrava-se em repouso e feita a média aritmética de aproximadamente 10 inspirações ou expirações.

$\Delta P_K$  = é a variação de pressão dentro da câmara, sem o animal, causada pela injeção de um volume conhecido de ar na câmara, por ocasião da calibração do sistema. É um valor em centímetros obtido nos registros gráficos.

$T^0_C$  = temperatura da câmara em °K obtida no momento do registro, após a adaptação do animal. Para isto, foi colocado um termômetro na parede interna da câmara.

$T^0_a$  = temperatura ambiente em °K, observada por um termômetro localizado nas proximidades de onde foram feitos os registros.

$T^0_P$  = temperatura do pulmão do animal em °K (311 °K, Bartlett, 1971).

$P_b$  = pressão barométrica (unidade = TORR).

$P_{CH_2O}$  = pressão de vapor de água na câmara determinada em tabela a partir da T (°C) da câmara (unidade = TORR).

$P_{PH_2O}$  = pressão de vapor de água dos pulmões do animal determinada a partir da T (°C) dos pulmões (unidade = TORR).

### 10.1 – Fator de Correção

Após a obtenção do volume corrente pelos cálculos descritos acima, foi feita uma correção para desconsiderar o espaço físico ocupado pelo animal dentro da câmara, no momento do registro, para garantir que outras variáveis não pudessem interferir e desta forma alterar os valores, como por exemplo, o peso dos animais.

Onde:

$$\text{Fator de Correção} = \frac{V_{CÂMARA} - V_{RATO}}{V_{CÂMARA}}$$

$$\text{VOLUME CORRENTE CORRIGIDO} = \text{Fator de Correção} \cdot V_c$$

$V_{CÂMARA}$  = Volume da câmara sem o animal (unidade = mililitros).

$V_{RATO}$  = peso do animal (unidade = gramas).

### 10.2 – Outras Variáveis Ventilatórias Estudadas

- Frequência Respiratória (FR): calculada a partir dos registros ventilatórios. Foi feita a média aritmética dos 4 períodos de registros. Expressa em respirações por minuto (rpm).

- Ventilação Pulmonar (VP): calculada pelo produto entre o volume corrente corrigido e a frequência respiratória. Os dados foram normalizados pelo peso do rato.
- Espaço morto ( $E_M$ ): 0,5 mL (Campoccia et al., 2010)
- Ventilação alveolar ( $V_A$ ): calculada pela seguinte fórmula =  $(V_C - E_M) \cdot FR$

### 11.0 – Avaliação Gasométrica

Ao final dos registros cardiovasculares, uma pequena alíquota de sangue (0,2 ml) arterial foi retirada através da cânula arterial do animal através de uma seringa previamente heparinizada para que fossem realizadas as análises de  $PaO_2$ ,  $PaCO_2$ , bicarbonato de sódio ( $HCO_3^-$ ), potencial hidrogeniônico (pH) e % de saturação da hemoglobina ( $SaO_2$ ). As análises foram realizadas através do aparelho Radiometer Copenhagen (ABL555) no Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) no Laboratório de Urgência.

### 12.0 – Pesagem das câmaras cardíacas

Ao final de cada protocolo experimental, os animais foram sacrificados com uma superdose de anestésico (pentobarbital sódico) e foi realizada uma abertura na linha média do tórax do animal para permitir o acesso e retirada do coração. As câmaras cardíacas (ventrículos direito e esquerdo) foram separadas e pesadas em balança de precisão (AND – GR-200).

O peso úmido foi obtido ao final do experimento. Para a determinação do peso seco, as câmaras foram mantidas em estufa a 60°C por um período de 24

horas para sua desidratação e posteriormente pesadas. O peso das câmaras foi corrigido pelo peso corporal dos animais.

### **13.0 – Determinação do índice pulmonar**

A hipertrofia ventricular direita foi avaliada através da determinação do índice de *Fulton* ou índice pulmonar. Segundo Fulton et al. (1952), na separação das câmaras cardíacas, o VD deve ser isolado do VE e septo, sendo que estes últimos formam um único conjunto. Desta forma, este índice foi calculado pela razão entre o peso úmido do VD e o peso úmido do VE + septo, ambos corrigidos pelo peso corporal, ou seja, g/100g. Este índice foi utilizado previamente em outro estudo experimental de HAP (Al-Ansari et al., 2007).

### **14.0 – Histologia**

Após a retirada dos corações, os pulmões dos animais foram retirados e perfundidos pela traqueia passivamente por gravidade (50 cm de altura) com formol tamponado a 10%. Foram realizados cortes no lóbulo médio do pulmão direito, os quais foram adicionados em cassete, desidratados em etanol e incluídos em parafina para microtomia. Em seguida foram realizados cortes de 6 µm e corados com hematoxilina/eosina (HE). As imagens foram capturadas em microscópio trinocular ZEISS AXIOSTAR acoplado a câmara digital MDC200, com objetivas de 5X, 10X e 40X. Foram tomados aleatoriamente 6 campos microscópicos para avaliar a morfometria dos ramos das artérias pulmonares. A espessura da parede, diâmetro externo (2x a espessura da parede + lúmen) e o diâmetro do lúmen foram tomados diretamente das fotomicrografias de uma escala com os mesmos aumentos (5x e

40x) da fotomicrografias do pulmão. Para avaliarmos a espessura da parede vascular foram utilizados os valores, em micrometros, tomados das fotomicrografias de 40x. Estes valores de espessura e lúmen foram corrigidos pelo valor do diâmetro externo dos vasos.

A contagem de vasos pulmonares terminais muscularizados junto aos sacos alveolares foi feita diretamente em fotomicrografias tomadas de 5x, sendo contados ramos arteriais que apresentaram a muscular evidente.

A espessura da parede e o diâmetro da luz (lumen) foram medidos usando como referência o menor diâmetro dos vasos avaliados. Estes parâmetros foram calculados como a percentagem da espessura da parede e a percentagem de área do lúmen das artérias muscularizadas, utilizando as seguintes fórmulas:

$$\text{Percentagem da espessura da parede (\%)} = \frac{(\text{espessura da camada média} \times 2)}{(\text{diâmetro externo})} \times 100$$

$$\text{Percentagem de área luminal (\%)} = \frac{(\text{área luminal})}{(\text{diâmetro externo})} \times 100$$

Os valores médios obtidos para cada animal correspondeu à medição de três artérias.

## 15.0 – Avaliação dos Reflexos Cardiovasculares

### 15.1 – Barorreflexo

O método utilizado para estimulação dos barorreceptores foi o de infusão contínua, por meio de bomba de infusão (Harvard, 600-900V, Dover, EUA), de fenilefrina (Hidrocloridrato de fenilefrina – Sigma, EUA), na dose de 0,05 mg/ml, e nitroprussiato de sódio (Nipride, Roche, Brasil) na dose de 1,0 mg/ml. O fluxo utilizado foi de 50 µg/ml/min, o qual foi mantido até que fosse obtida elevação ou diminuição da PAM de 50 mmHg em relação à linha de base. Posteriormente, os valores de FC correspondentes às alterações de PAM foram tomados em intervalos de  $\pm 10$  mmHg.

A sensibilidade (ganho) do barorreflexo à fenilefrina foi calculada dividindo-se a bradicardia máxima pelo valor de pico da resposta pressora. Para o ganho do barorreflexo ao nitroprussiato sódio, o cálculo foi feito considerando-se a taquicardia máxima e o valor de pico da resposta depressora.

Para complementar a avaliação, o ganho também foi avaliado através dos cálculos de slope (vide Anexo III), obtido através da razão entre a PAM/ FC (bpm/mmHg) de cada animal .

### 15.2 – Quimiorreflexo

Os quimiorreceptores carotídeos foram ativados através de injeções aleatórias de Cianeto de Potássio (KCN) (10, 20, 40 e 80 µg/0,05 ml/rato IV), *in bolus*, e as alterações de PAM e FC foram então registradas. O Cianeto é descrito na literatura como um potente estímulo para os quimiorreceptores periféricos (Biscoe



e Duchen, 1990; Franchini e Krieger, 1997) atuando por inibição da enzima citocromo-oxidase envolvida na cadeia respiratória.

### **15.3 – Reflexo Bezold-Jarisch (RBJ)**

O RBJ foi induzido através de injeções (*in bolus*) em doses aleatórias de fenilbiguanida (FBG) (1,5; 3; 6; 12 e 24 µg/kg IV) e as alterações de PAM e FC foram registradas. Esta droga estimula quimicamente os receptores cardiopulmonares por ativarem os receptores 5-HT<sub>3</sub>, localizados nas câmaras cardíacas e vasos pulmonares (Mark, 1983). A sensibilidade do RBJ foi determinada pelo cálculo do ganho de cada dose de FBG administrada para cada animal. A partir destes valores, foi determinado o ganho médio de cada animal, assim como a média de cada grupo estudado. O cálculo do ganho de cada dose foi obtido dividindo-se o valor da resposta bradicárdica pelo valor de pico da resposta hipotensora obtida.

### **16.0 – Bloqueios Autonômicos**

O bloqueio autonômico foi realizado com a finalidade de avaliarmos os componentes simpático e parassimpático cardíacos, bem como auxiliar no entendimento das alterações cardiovasculares observadas. Para tanto, foi realizado o bloqueio dos adrenoreceptores  $\beta_1$  com atenolol nas dose de (2 mg/Kg) (IV) e dos colinorreceptores muscarínicos com metil-atropina (2 mg/Kg) (IV), e as alterações de frequência cardíaca basal foram analisadas antes e após 15 minutos da realização de cada bloqueio.

A avaliação do componente simpático foi feita subtraindo-se o valor de FC após o bloqueio com o atenolol do valor da FC basal. Para o componente

parassimpático, foi subtraído o valor de FC obtido após o bloqueio combinado de atenolol + metil-atropina do valor de FC obtido após o bloqueio com atenolol.

## 17.0 – Protocolo Experimental

Os 72 animais selecionados para participar do estudo receberam uma injeção subcutânea de MCT (N = 36) ou veículo (solução salina, N = 36). Um período de 21 dias foi esperado para possibilitar total indução da HAP. Em seguida, os animais do grupo CPT e MCT-CPT foram tratados com captopril durante 14 dias em água potável *ad libitum*, enquanto os animais dos grupos CON e MCT receberam veículo (água) *ad libitum*. No final destes tratamentos (35 dias), 36 animais dos quatro grupos (9 animais por grupo) foram anestesiados e cateterizados e, um dia depois, foram submetidos, primeiro a avaliação dos reflexos cardiovasculares (baro e chemoreflexes) e, em seguida, a avaliação do componente autonômico (ambas as medidas com os animais acordados). Ao final dos registros, uma amostra de sangue arterial foi coletado de todos os animais estudados para permitir a gasometria arterial. Para realizar outras análises, os 36 animais restantes (9 animais por grupo) foram submetidas a medições respiratórias (animais acordados). Em seguida, sob anestesia, eles foram submetidos a medidas hemodinâmicas de pressão ventricular. No final, os ratos foram sacrificados com uma *overdose* de anestésico, e o coração e os pulmões foram retirados, pesados, e utilizados para a análise morfológica.

## 18.0 – Drogas e substâncias utilizadas

- Monocrotalina (Sigma, St. Louis, EUA).
- Captopril (DEG , Índia).
- Atenolol (Sigma, St. Louis, EUA).
- Metil-Atropina (Sigma, St. Louis, EUA).
- Heparina (Liquemine, Roche, RJ, Brasil).
- Pentobarbital sódico (Cristália, São Paulo, Brasil).
- Solução Fisiológica (salina, 0,9%).

## 19.0 – Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). Os métodos estatísticos utilizados foram: análise de variância (ANOVA) de uma via para medidas repetidas, com análise *Pós-Hoc* pelo teste de *Fisher*, os quais foram empregados conforme o protocolo experimental realizado. As diferenças estatísticas foram fixadas como sendo significativas para \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ .

## **RESULTADOS**

## RESULTADOS

A apresentação dos resultados do presente estudo foi dividida em sete categorias: avaliação hemodinâmica, medidas de peso corporal e ventricular, avaliação respiratória, avaliação gasométrica, avaliação autonômica, avaliação reflexa e avaliação histológica. Estas divisões foram adotadas para facilitar o entendimento dos resultados.

### **1.0 – Avaliações hemodinâmicas**

#### **1.1 – Valores de frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial pulsátil (PP).**

Na tabela I encontram-se representados os valores basais dos sinais vitais dos grupos controle (CON), tratados com monocrotalina (MCT), tratados com captopril (CPT) e tratados com monocrotalina e captopril (MCT-CPT). Conforme podemos visualizar, os valores basais de FC foram maiores ( $p < 0,01$ ) nos animais do grupo MCT em comparação com os grupos CON e MCT-CPT, sendo os grupos CPT e CON semelhantes entre si. Não foram observadas diferenças entre os quatro grupos de estudos no que diz respeito aos valores basais de PAS, PAD, PAM e PP ( $p > 0,05$ ).

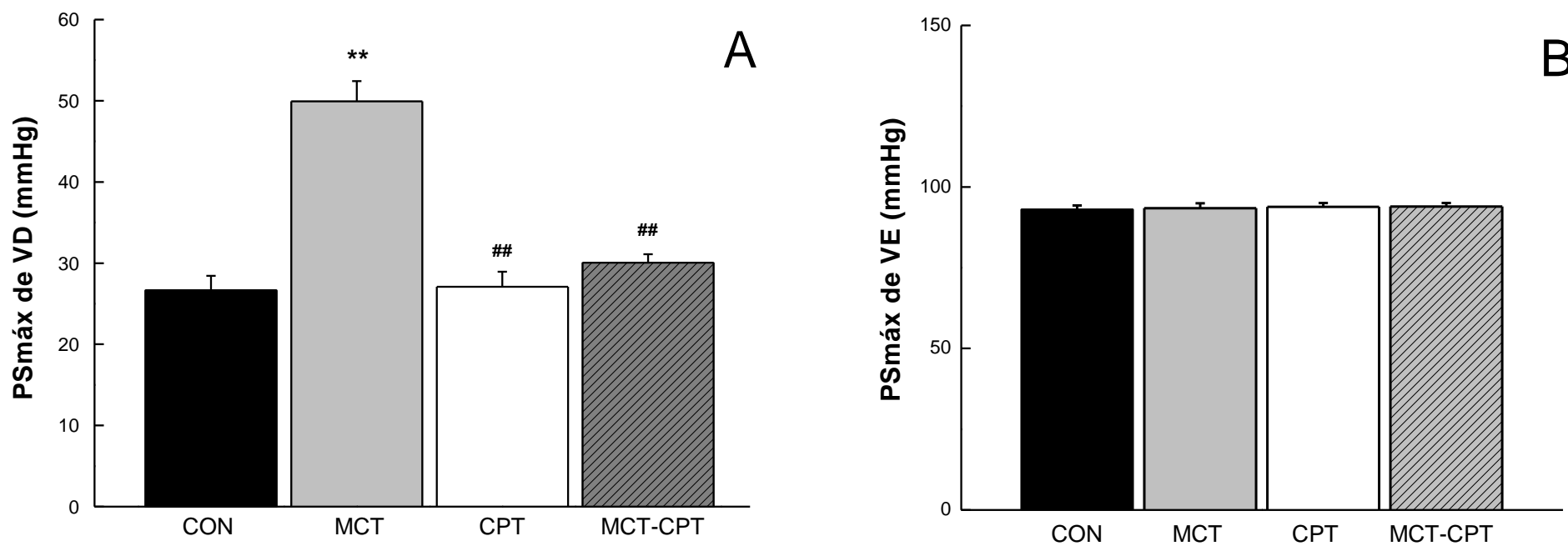
**Tabela I** - Valores de FC (bpm), PAS (mmHg), PAD (mmHg), PAM (mmHg) e PP (mmHg) dos grupos CON, MCT, CPT e MCT-CPT.

Parâmetros	GRUPOS			
	CON (n=9)	MCT (n=8)	CPT (n=9)	MCT-CPT (n=9)
FC (bpm)	351 ± 18	422 ± 12**	379 ± 12	359 ± 17
PAS (mmHg)	122 ± 6	124 ± 7	106 ± 6	112 ± 6
PAD (mmHg)	89 ± 6	81 ± 5	82 ± 7	88 ± 8
PAM (mmHg)	96 ± 4	95 ± 5	87 ± 2	93 ± 4
PP (mmHg)	41 ± 3	44 ± 3	41 ± 1	40 ± 2

Os valores representam à média ± EPM. \*\*p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.

## 1.2 – Medidas das pressões intraventriculares e derivadas

No que se refere à avaliação hemodinâmica das pressões ventriculares, observa-se na figura 2A que o tratamento com MCT elevou de forma significativa os valores de pressão sistólica máxima de ventrículo direito (PSmáx de VD) nos animais do grupo MCT quando comparados com os animais do grupo CON ( $49,92 \pm 2,51^{**}$  vs  $27,28 \pm 1,88$  mmHg, respectivamente. \*\*p<0,01), e o tratamento com captopril normalizou este aumento, uma vez que os animais do grupo MCT-CPT apresentaram este parâmetro semelhante ao grupo CON ( $30,06 \pm 3,88$  vs  $27,28 \pm 1,88$  mmHg, respectivamente. p>0,05). Conforme esperado, os animais sem HAP tratados com captopril (grupo CPT), apresentaram valores de PSmáx de VD semelhantes aos animais do grupo CON ( $27,10 \pm 1,84$  vs  $27,28 \pm 1,88$  mmHg, respectivamente. p>0,05). Entretanto, os valores de pressão sistólica máxima de VE (PSmáx de VE) foram semelhantes nos quatro grupos de estudo (CON=  $93,08 \pm 1,20$ , MCT=  $93,41 \pm 1,52$ , CPT=  $93,85 \pm 1,15$  e MCT-CPT=  $93,63 \pm 1,15$  mmHg. p>0,05), como podemos visualizar na figura 2B.



**Figura 2** – Valores da pressão sistólica máxima do ventrículo direito (PSmáx de VD) (A) e do ventrículo esquerdo (PSmáx de VE) (B) dos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), captopril (CPT) e monocrotalina captopril (MCT-CPT). \*\*p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. ##p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.

Na tabela II estão representadas as medidas derivadas da pressão ventricular direita e da pressão ventricular esquerda. Em relação à pressão diastólica final de ventrículo direito (PDF de VD), observamos um comportamento semelhante ao observado na PSmáx de VD, ou seja, aumento significativo dos valores do grupo MCT em relação aos grupos CON, CPT e MCT-CPT. Os grupos tratados com captopril (CPT e MCT-CPT) obtiveram valores normais quando comparados ao grupo controle.

Resultados semelhantes foram também observados na análise da relação negativa entre a derivada de pressão e a derivada de tempo de ventrículo direito ( $dP/dT(-)$  de VD), sendo este parâmetro maior no grupo MCT em comparação aos demais grupos, enquanto nos grupos tratados com captopril (grupos CPT e MCT-CPT) os valores de  $dP/dT(-)$  de VD foram semelhantes aos obtidos no grupo CON. Já a relação positiva entre a derivada de pressão e a derivada de tempo de ventrículo direito ( $dP/dT(+)$  de VD) foi menor no grupo MCT apenas quando comparado aos grupos CON e CPT sendo semelhante ao grupo MCT-CPT. O grupo CPT apresentou a  $dP/dT(+)$  de VD semelhante ao grupo CON.

Em relação à análise das medidas derivadas do VE, observou-se a mesma resposta obtida na PSmáx de VE, ou seja, os quatro grupos de estudo foram semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ) no que se refere à pressão diastólica final de VE (PDF de VE), relação positiva entre a derivada de pressão e a derivada de tempo de VE ( $dP/dT(+)$  de VE) e à relação negativa entre a derivada de pressão e a derivada de tempo ( $dP/dT(-)$  de VE).



**Tabela II** – Valores das medidas derivadas das pressões ventriculares: pressão diastólica final de VD (PDF de VD), relação positiva entre a derivada de pressão e a derivada de tempo de ventrículo direito (dP/dT(+)) de VD), relação negativa entre a derivada de pressão e a derivada de tempo de ventrículo direito (dP/dT(-)) de VD), pressão diastólica final de VE (PDF de VE), relação positiva entre a derivada de pressão e a derivada de tempo de ventrículo esquerdo (dP/dT(+)) de VE), relação negativa entre a derivada de pressão e a derivada de tempo (dP/dT(-)) de VE).

Parâmetros	GRUPOS			
	CON (n=9)	MCT (n=9)	CPT (n=9)	MCT-CPT (n=9)
PDF de VD (mmHg)	2,2±1,0	6,7±1,9**	3,8±1,0 <sup>##</sup>	3,9±0,7 <sup>##</sup>
dP/dT(+) de VD (mmHg/s)	1639,5±127,0	2228,9±180,3*	1596,9±203,6 <sup>#</sup>	1714,1±168,3
dP/dT(-) de VD (mmHg/s)	-1370,3±99,8	-1844,2±164,8*	- 1390,4±163,3 <sup>#</sup>	-1405,7±186,9 <sup>#</sup>
PDF de VE (mmHg)	10,5±0,9	10,0±1,5	10,9±0,9	10,7±0,9
dP/dT(+) de VE (mmHg/s)	5063,8±275,0	5310,8±214,0	5144,9±198,6	5160,2±190,6
dP/dT(-) de VE (mmHg/s)	-5166,7±275,0	-5505,2±323,2	-5206,4±267,8	-5278,6±262

Os valores representam à média ± EPM. \*p<0,05 e \*\*p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. <sup>#</sup>p<0,05 e <sup>##</sup>p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.

## **2. Medidas de peso corporal, peso ventricular e Índice pulmonar**

### **2.1– Peso corporal, peso úmido e peso seco dos ventrículos direito e esquerdo**

Na tabela III apresentamos os valores de peso corporal inicial e final (g), pesos úmido e seco do VD e VE (mg), pesos úmido e seco do ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE) corrigidos pelo peso corporal (mg/g) e porcentagem de desidratação do VD e do VE dos grupos CON, MCT, CPT e MCT-CPT.

Podemos observar que os animais do grupo MCT obtiveram peso corporal final significativamente menor em relação aos animais do grupo CON. Já os animais do grupo MCT-CPT apresentaram maior peso corporal quando comparados ao MCT e menor em relação ao grupo CON.

Em relação ao peso úmido do VD (sem correção), observamos que os animais MCT, mostraram valores significantemente aumentados em relação ao grupo controle. Após o tratamento destes animais com captopril (grupo MCT-CPT), observamos uma melhora deste parâmetro, entretanto sem normalização, uma vez que, embora tenhamos obtido uma redução significativa do peso úmido do VD no grupo MCT-CPT quando comparado ao MCT, este se manteve superior aos valores obtidos no grupo CON. O mesmo foi observado através da análise do peso úmido do VD corrigido pelo peso corporal, ou seja, o grupo MCT apresentou valores maiores em comparação ao CON com melhora em resposta ao tratamento com captopril, porém sem normalização quando comparado ao grupo CON (MCT > MCT-CPT > CON).

A análise do peso seco do VD (tanto em valores absolutos como corrigido pelo peso corporal) mostrou resultados semelhantes aos obtidos na análise do peso úmido de VD, ou seja, os animais do grupo MCT mostraram valores

significativamente aumentados em relação ao grupo CON e o tratamento com captopril nestes animais (grupo MCT-CPT) possibilitou uma melhora deste parâmetro, porém sem normalização, uma vez que apesar da redução significativa do peso seco do VD no grupo MCT-CPT, os valores apresentados foram maiores em comparação aos grupos CON e CPT.

Em relação aos valores de peso seco e úmido do VE, tanto em valores absolutos como corrigidos pelo peso corporal, todos os grupos de estudo foram semelhantes entre si ( $p>0,05$ ).

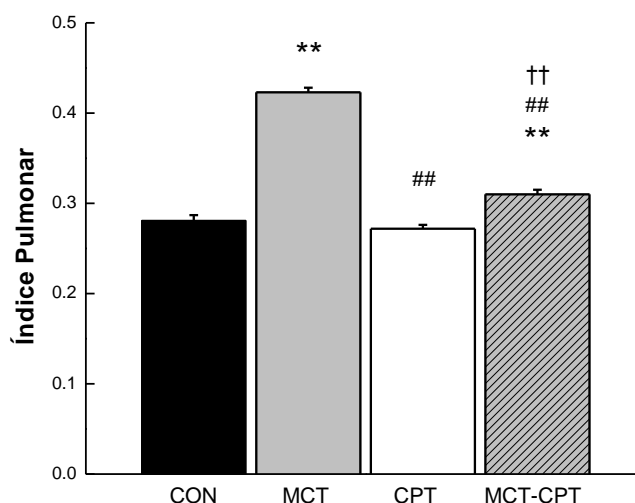
**Tabela III** – Valores de peso corporal inicial e final (g), peso úmido de VD e VE (mg), peso úmido corrigido de VD e VE (mg/g), peso seco VD e VE (g), peso seco corrigido de VD e VE (mg/g) dos grupos controle CON, MCT, CPT e MCT-CPT.

Parâmetros	GRUPOS			
	CON (n=9)	MCT (n=9)	CPT (n=9)	MCT-CPT (n=9)
Peso Corporal Inicial (g)	191,8 ± 1,2	191,1 ± 1,8	193,0 ± 1,8	193,8 ± 1,8
Peso Corporal Final (g)	315,7 ± 3,4	238,6 ± 5,8**	313,1 ± 3,2 <sup>##</sup>	291,1 ± 3,9** <sup>##††</sup>
Ganho ponderal (g)	124 ± 1	48 ± 6**	120 ± 4 <sup>##</sup>	97 ± 4** <sup>##††</sup>
Peso Úmido VD (mg)	219,7 ± 4,3	325,7 ± 3,9**	210,0 ± 3,1 <sup>##</sup>	239,9 ± 2,8** <sup>##††</sup>
Peso Úmido VD corrigido (mg/100g)	114,7 ± 2,9	170,5 ± 2,7**	108,8 ± 1,5 <sup>##</sup>	123,9 ± 2,3** <sup>##††</sup>
Peso Seco VD (g)	87,1 ± 1,5	130,0 ± 2,3**	88,1 ± 2,1 <sup>##</sup>	95,1 ± 1,3** <sup>##†</sup>
Peso Seco VD corrigido (mg/100g)	45,5 ± 1,2	68,1 ± 1,5**	45,7 ± 1,1	49,1 ± 1,0** <sup>##†</sup>
% de desidratação de VD	60,3 ± 0,6	60,0 ± 0,6	58,0 ± 0,9	60,4 ± 0,2
Peso Úmido VE (mg)	781,0 ± 3,1	770,9 ± 5,4	772,9 ± 4,4	773,8 ± 6,3
Peso Úmido VE corrigido (mg/100g)	407,6 ± 4,9	403,5 ± 3,8	400,7 ± 4,2	399,6 ± 5,1
Peso Seco VE (mg)	299,3 ± 3,2	295,0 ± 3,8	319,4 ± 3,2	285,4 ± 6,3
Peso Seco VE corrigido (mg/100g)	38,3 ± 0,4	38,9 ± 0,5	41,4 ± 0,4	38,9 ± 0,6
% de desidratação de VE	61,7 ± 0,4	61,1 ± 0,5	58,7 ± 0,4	63,1 ± 0,6

Os valores representam à média ± EPM. \*p<0,05 e \*\*p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. <sup>##</sup>p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT. <sup>†</sup>p<0,05 e <sup>††</sup>p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CPT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.

## 2.2 – Valores do Índice Pulmonar (Índice de Fulton)

Na figura 3, está representado o índice pulmonar dos animais dos grupos CON, MCT, CPT e MCT-CPT. Este índice é representado através da razão do peso úmido do VD pelo peso úmido do VE mais o septo interventricular. Conforme podemos observar, os animais do grupo MCT obtiveram um aumento significativo do índice pulmonar em relação ao grupo CON ( $0,423 \pm 0,005^{**}$  vs  $0,281 \pm 0,006$ , respectivamente.  $^{**}p<0,01$ ). Quando os animais que receberam monocrotalina foram tratados com captopril (grupo MCT-CPT), ocorreu uma redução deste índice em relação ao grupo MCT ( $0,310 \pm 0,005^{##}$  vs  $0,423 \pm 0,005$ , respectivamente.  $^{##}p<0,01$ ), porém sem normalização, uma vez que este permaneceu significativamente maior no grupo MCT-CPT em comparação ao grupo CON ( $0,310 \pm 0,005^{**}$  vs  $0,281 \pm 0,006$ , respectivamente.  $^{**}p<0,01$ ). Os grupos que não foram tratados com monocrotalina (grupos CON e CPT) apresentaram valores de índice de Fulton semelhantes entre si ( $0,281 \pm 0,006$  vs  $0,272 \pm 0,004$  respectivamente.  $p>0,05$ ). Conforme esperado, considerando a semelhança entre os grupos CON e CPT, este grupo (CPT) também apresentou valores menores deste índice quando comparado aos grupos MCT ( $0,272 \pm 0,004^{\dagger\dagger}$  vs  $0,423 \pm 0,005$ , respectivamente.  $^{\dagger\dagger}p<0,01$ ) e MCT-CPT ( $0,272 \pm 0,004^{\dagger\dagger}$  vs  $0,31 \pm 0,005$ , respectivamente.  $^{\dagger\dagger}p<0,01$ ).



**Figura 3** – Valores de índice pulmonar dos animais dos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), captopril (CPT) e monocrotalina+captopril (MCT-CPT). \*\* $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. ## $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT. †† $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CPT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.

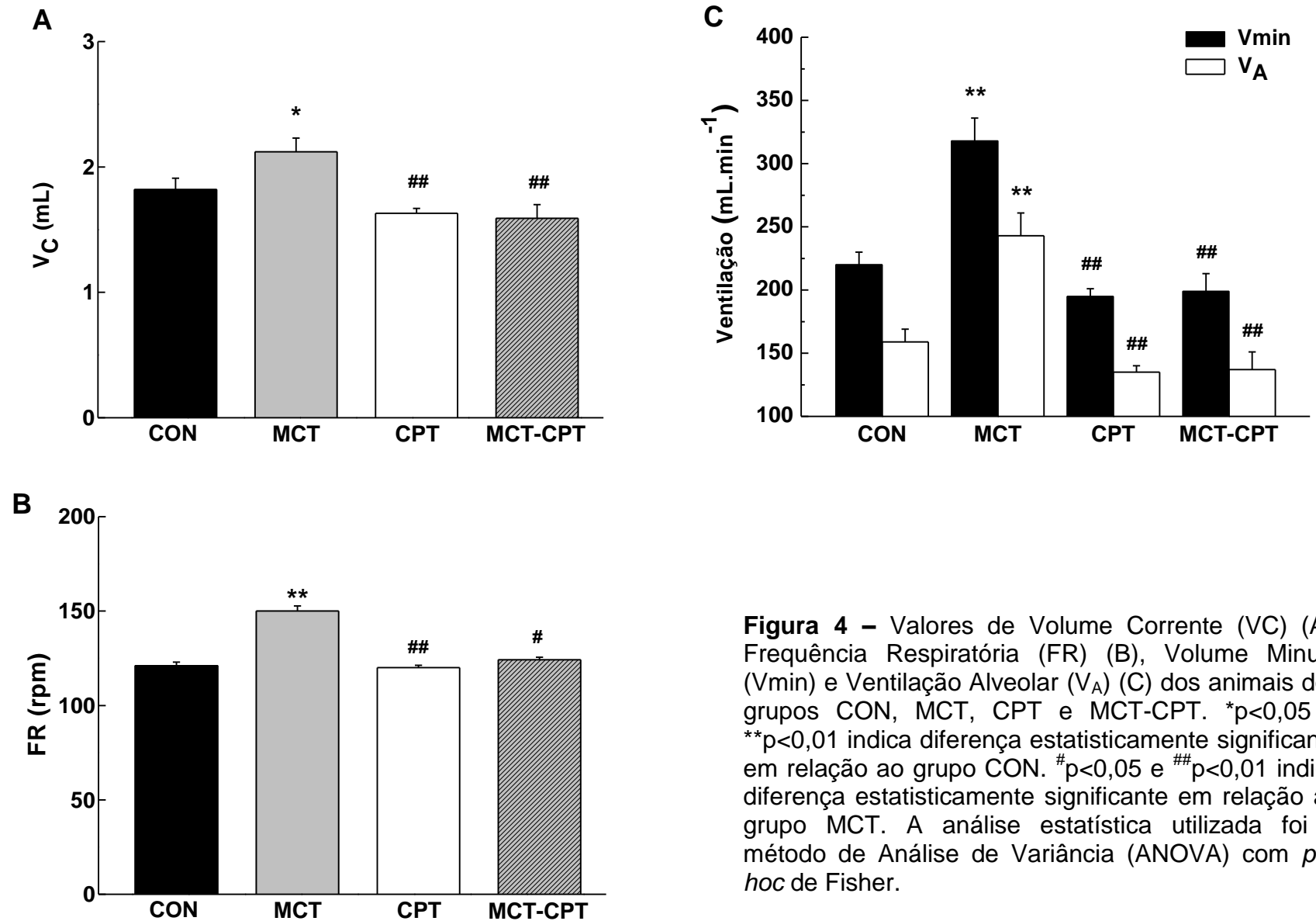
### 3.0 – Avaliações Ventilatórias

Na figura 4, estão representados os valores de Volume Corrente (VC) corrigido, Frequência respiratória (FR), Volume Minuto (Vmin) e Ventilação Alveolar ( $V_A$ ) dos grupos CON, MCT, CPT e MCT-CPT.

A análise dos valores de VC corrigido dos animais do grupo MCT evidenciou um aumento significativo deste parâmetro em relação aos grupos CON ( $2.12 \pm 0.11$  vs  $1.82 \pm 0.09$  ml, respectivamente. \* $p < 0,05$ ), CPT ( $2.12 \pm 0.11$  vs  $1.63 \pm 0.04$  ml, respectivamente. ## $p < 0,01$ ) e MCT-CPT ( $2.12 \pm 0.11$  vs  $1.59 \pm 0.11$  ml, respectivamente. ## $p < 0,01$ ), sendo os grupos CON, CPT e MCT-CPT semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ). Resultados semelhantes foram observados em relação à FR, ou seja, os animais do grupo MCT apresentaram um aumento significativo FR tanto em

relação ao grupo CON ( $150 \pm 2,76$  vs  $121 \pm 1,92$  rpm, respectivamente.  $^{**}p<0,01$ ) como em relação aos grupos CPT e MCT-CPT ( $150 \pm 2,76$  vs  $120 \pm 1,26^{##}$  e  $126 \pm 1,87$  rpm<sup>#</sup>, respectivamente.  $^{##}p<0,01$  e  $^{\#}p<0,05$ ). Os grupos CON e CPT apresentaram valores de FR semelhantes ( $p>0,05$ ).

Os valores de ventilação alveolar ( $V_A$ ) foram maiores no grupo MCT em comparação aos grupos CON ( $243 \pm 18^{**}$  vs  $159 \pm 10$  ml.min<sup>-1</sup>, respectivamente.  $^{**}p<0,01$ ), CPT ( $243 \pm 18$  vs  $135 \pm 5^{##}$  ml.min<sup>-1</sup>, respectivamente.  $^{##}p<0,01$ ) e MCT-CPT ( $243 \pm 18$  vs  $137 \pm 14$  ml.min<sup>-1</sup>, respectivamente.  $^{##}p<0,01$ ), sendo os grupos CPT, CON e MCT-CPT semelhantes entre si ( $p>0,05$ ). O mesmo padrão de resposta foi observado na análise do  $V_{min}$ , uma vez que este parâmetro também se apresentou maior no grupo MCT quando comparado com os grupos CON ( $318 \pm 18$  vs  $220 \pm 10$  ml.min<sup>-1</sup>, respectivamente.  $^{**}p<0,01$ ), CPT ( $318 \pm 18$  vs  $195 \pm 6$  ml.min<sup>-1</sup>, respectivamente.  $^{##}p<0,01$ ) e MCT-CPT ( $318 \pm 18$  vs  $199 \pm 14$  ml.min<sup>-1</sup>, respectivamente.  $^{##}p<0,01$ ); sendo os grupos CPT, CON e MCT-CPT semelhantes entre si ( $p>0,05$ ).





#### 4.0 – Avaliações gasométricas

Na tabela IV estão representados os valores gasométricos de pressão parcial arterial de oxigênio ( $\text{PaO}_2$ ), pressão parcial arterial de dióxido de carbono ( $\text{PaCO}_2$ ), saturação arterial de oxigênio ( $\text{SaO}_2$ ), potencial hidrogeniônico (pH) e bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ).

Podemos observar que os valores de  $\text{PaO}_2$  e  $\text{SaO}_2$  dos animais do grupo MCT foi significativamente menor quando comparado aos demais grupos ( $p < 0,01$ ), sendo os grupos CON, CPT e MCT-CPT semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ).

A análise da  $\text{PaCO}_2$  e do  $\text{HCO}_3^-$  também evidenciou uma resposta diferente no grupo MCT, com valores maiores de ambos os parâmetros em comparação aos demais grupos ( $p < 0,01$ ), sendo os grupos CON, CPT e MCT-CPT semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ).

O pH, que é um parâmetro influenciado diretamente pelos níveis de  $\text{PaCO}_2$  e  $\text{HCO}_3^-$ , foi menor no grupo MCT quando comparado ao CON ( $p < 0,05$ ), e quando comparado aos grupos CPT ( $p < 0,05$ ) e MCT-CPT ( $p < 0,01$ ). Os grupos CON, CPT e MCT-CPT foram semelhantes no que se refere à análise do pH ( $p > 0,05$ ).

**Tabela IV:** Valores gasométricos de pressão parcial arterial de oxigênio ( $P_{aO_2}$ ), pressão parcial arterial de dióxido de carbono ( $P_{aCO_2}$ ), saturação arterial de oxigênio ( $SaO_2$ ), potencial hidrogeniônico (pH) e bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) dos grupos controle CON, MCT, CPT e MCT-CPT.

Parâmetros	GRUPOS			
	CON (n=7)	MCT (n=7)	CPT (n=7)	MCT-CPT (n=7)
<b>PaO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	97 ± 1	90 ± 2**	97 ± 0,4 <sup>##</sup>	97 ± 0,6 <sup>##</sup>
<b>PaCO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	36 ± 1	43 ± 1**	36 ± 1 <sup>##</sup>	37 ± 1 <sup>##</sup>
<b>SaO<sub>2</sub> (%)</b>	98 ± 0,2	95 ± 0,8**	98 ± 0,2 <sup>##</sup>	98 ± 0,4 <sup>##</sup>
<b>pH</b>	7,41 ± 0,01	7,36 ± 0,01*	7,41 ± 0,01 <sup>#</sup>	7,44 ± 0,04 <sup>##</sup>
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mmol.L-1)</b>	35 ± 0,4	46 ± 0,9**	36 ± 0,5 <sup>##</sup>	36 ± 0,6 <sup>##</sup>

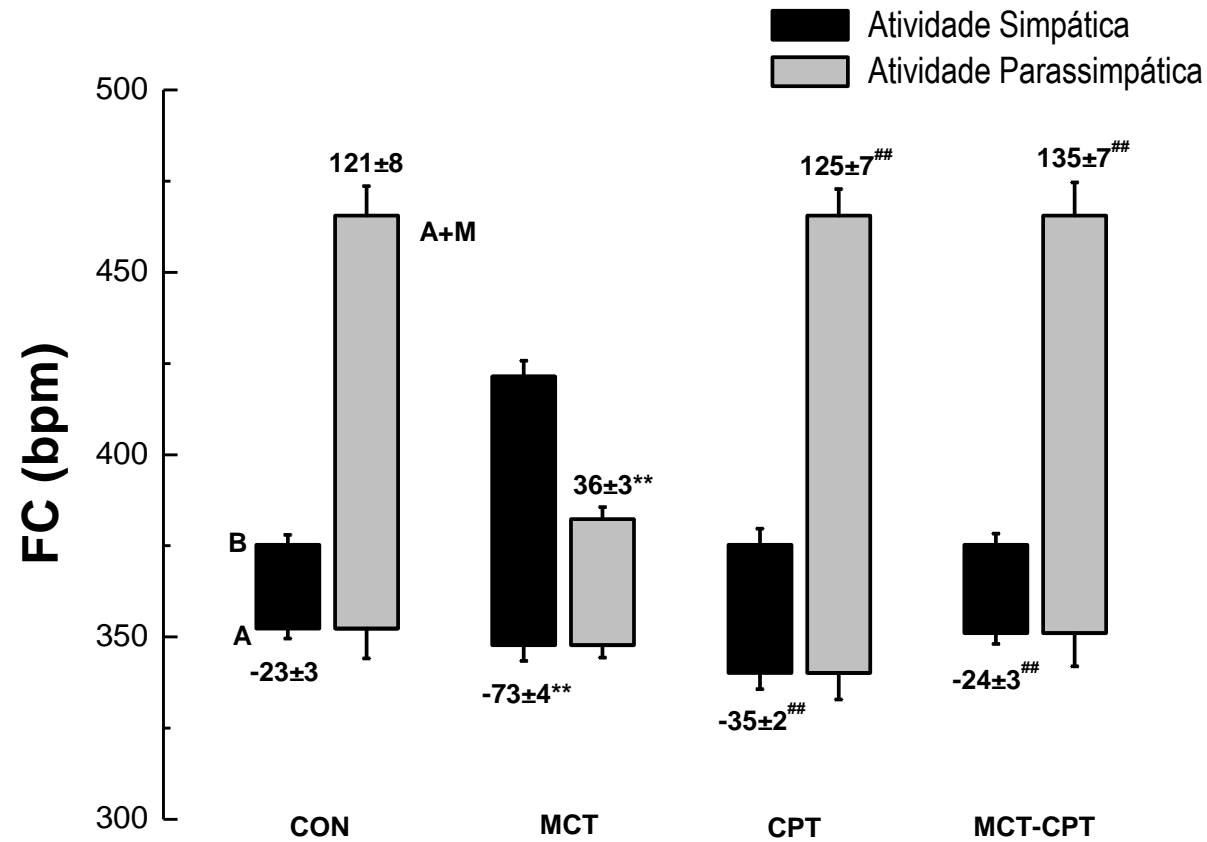
Os valores representam à média ± EPM. \*p<0,05 e \*\*p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. <sup>#</sup>p<0,05 e <sup>##</sup>p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.

## 5.0 – Avaliação autonômica

Na figura 5 encontram-se representados os valores do componente simpático e parassimpático dos animais dos grupos CON, MCT, CPT e MCT-CPT. Os valores do componente simpático representados foram obtidos subtraindo-se o valor de FC após o bloqueio com o atenolol do valor da FC basal.

Podemos observar um aumento do componente simpático no grupo MCT quando comparado ao grupo CON (\*\* $p < 0,01$ ). O grupo CPT, apresentou a atividade simpática elevada em comparação com os grupos CON (\* $p < 0,05$ ) e MCT-CPT ( $^{##}p < 0,01$ ) e reduzida em comparação com o grupo MCT ( $^{##}p < 0,01$ ). O grupo tratado com monocrotalina e captopril (grupo MCT-CPT) apresentou componente simpático semelhante ao grupo CON ( $p > 0,05$ ), mostrando a eficácia da droga utilizada na normalização deste componente.

Para avaliação do componente parassimpático, subtraiu-se o valor de FC obtido após o bloqueio combinado de atenolol + metil-atropina do valor de FC obtido após o bloqueio com atenolol. No que diz respeito a este componente, o grupo MCT apresentou uma redução em comparação aos grupos CON (\*\* $p < 0,01$ ) e CPT ( $^{##}p < 0,01$ ), sendo que o tratamento destes animais com captopril (grupo MCT-CPT) normalizou o componente parassimpático tornando-o semelhante ao grupo CON ( $p > 0,05$ ). Os grupos CON e CPT foram semelhantes entre si.



**Figura 5** – Valores de alteração da frequência cardíaca (FC) mediante administração de atenolol e metil- atropina dos animais dos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), captopril (CPT) e monocrotalina captopril (MCT-CPT). B: valor de FC ao nível basal, (A) valor de FC após atenolol, (A+M) valor de FC após atenolol + metil-atropina. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.

## 6.0 – Avaliação Reflexa

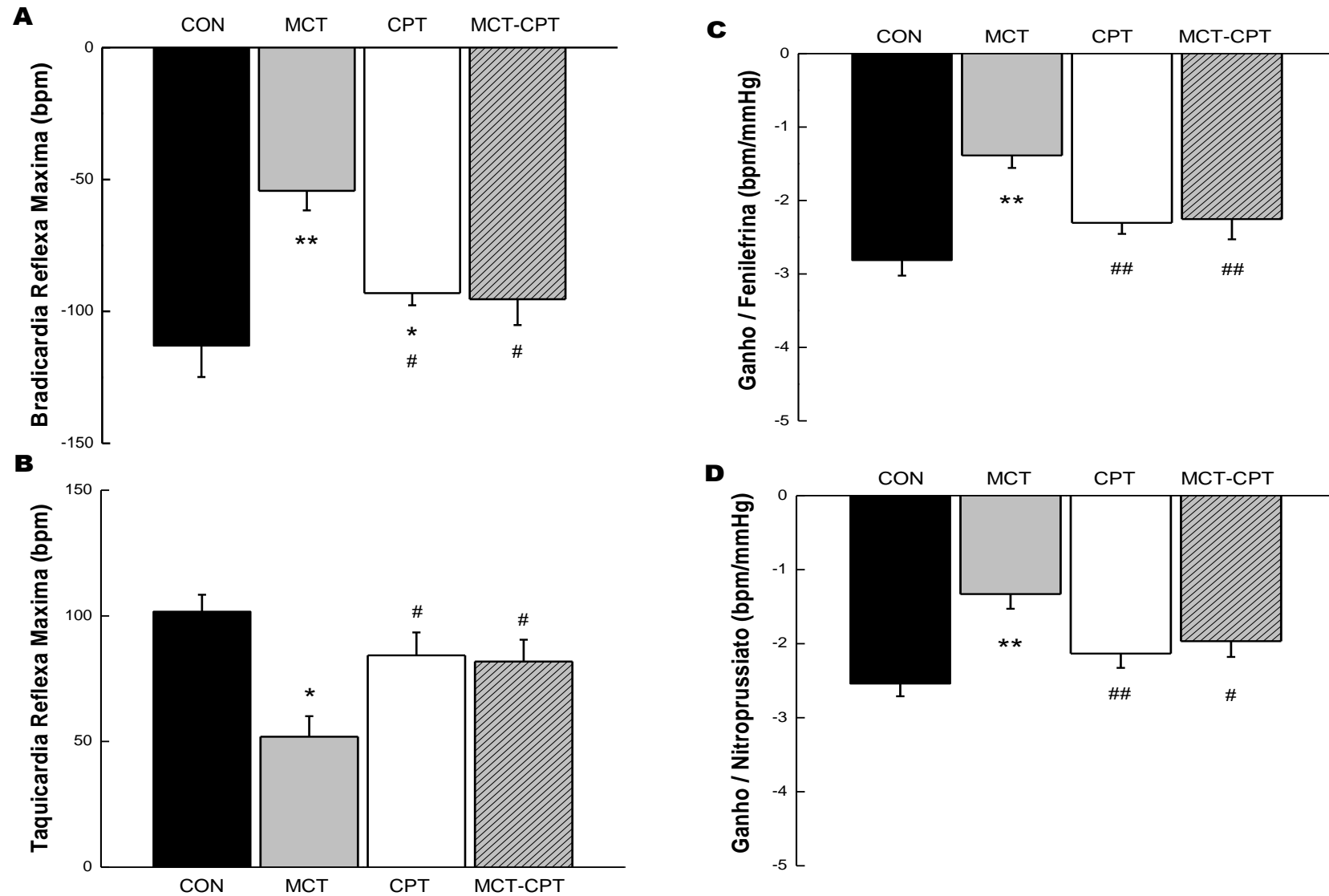
### 6.1 Barorreflexo

As análises barorreflexas evidenciaram que o grupo MCT, quando comparado ao grupo CON, apresentou uma atenuação da resposta bradicárdica máxima (Figura 6A) em resposta à fenilefrina ( $-54,31 \pm 7,4$  vs  $-113,1 \pm 11,8$  bpm/mmHg, respectivamente.  $*p<0,05$ ), sendo que o tratamento destes animais com Captopril normalizou esta resposta, tornando-a no grupo MCT-CPT semelhante à resposta obtida no grupo CON ( $-95,4 \pm 9,8$  vs  $-113,1 \pm 11,8$  bpm/mmHg, respectivamente.  $p>0,05$ ). O grupo CPT apresentou uma atenuação desta resposta quando comparado ao grupo CON ( $-93,1 \pm 4,6$  vs  $-113,1 \pm 11,8$  bpm/mmHg, respectivamente.  $p<0,05$ ), entretanto esta atenuação foi significativamente menos expressiva do que a observada no grupo MCT ( $-93,1 \pm 4,6$  vs  $-54,31 \pm 7,4$  bpm/mmHg, respectivamente.  $^{\#}p<0,05$ ) e foi semelhante à atenuação obtida no grupo MCT-CPT ( $-93,1 \pm 4,6$  vs  $-95,4 \pm 9,8$  bpm/mmHg, respectivamente.  $p>0,05$ ).

No que diz respeito à resposta taquicárdica máxima induzida pelo nitroprussiato (Figura 6B), os animais do grupo MCT também tiveram uma atenuação quando comparado ao grupo controle ( $51,9 \pm 8,2$  vs  $101,8 \pm 6,6$  bpm/mmHg, respectivamente.  $*p<0,05$ ). O tratamento destes animais com captopril normalizou esta resposta, sendo a taquicardia máxima obtida no grupo MCT-CPT semelhante ao grupo CON ( $81,8 \pm 8,7$  vs  $101,8 \pm 6,6$  bpm/mmHg, respectivamente.  $p>0,05$ ) e ao grupo CPT ( $81,8 \pm 8,7$  vs  $84,3 \pm 9,1$  bpm/mmHg, respectivamente.  $p>0,05$ ). Diferentemente do que foi observado na resposta bradicárdica máxima, os grupos CON e CPT apresentaram respostas taquicárdicas máximas semelhantes ( $84,3 \pm 9,1$  vs  $101,8 \pm 6,6$  bpm/mmHg, respectivamente.  $p>0,05$ ).

Para uma análise mais criteriosa do barorreflexo, fizemos também uma análise comparativa dos ganhos (slopes) dos quatro grupos de estudo em resposta à administração de fenilefrina. Como podemos observar na Figura 6 (C), os animais do grupo MCT tiveram uma redução (em valores absolutos) do ganho quando comparado ao grupo CON ( $-1,385 \pm 0,17$  vs  $-2,814 \pm 0,20$  bpm/mmHg, respectivamente.  $**p<0,01$ ). O tratamento destes animais com captopril normalizou esta resposta, normalizando o ganho do grupo MCT-CPT em comparação ao grupo CON ( $-2,252 \pm 0,27$  vs  $-2,814 \pm 0,20$  bpm/mmHg, respectivamente.  $p>0,05$ ), sendo este grupo também semelhante ao grupo CPT ( $-2,252 \pm 0,27$  vs  $-2,303 \pm 0,15$  bpm/mmHg, respectivamente.  $p>0,05$ ). Conforme esperado, os grupos CON e CPT apresentaram ganhos em resposta à fenilefrina semelhantes ( $84,3 \pm 9,1$  vs  $101,8 \pm 6,6$  bpm/mmHg, respectivamente.  $p>0,05$ ).

A análise comparativa dos ganhos dos quatro grupos de estudo em resposta à administração de nitroprussiato também foi realizada (Figura 5D), sendo obtida uma resposta semelhante à observado no *slope* em resposta a fenilefrina, ou seja, uma redução do ganho no grupo MCT em comparação aos grupos CON e CPT (MCT=  $-1,33 \pm 0,19$ , CON=  $-2,544 \pm 0,16$  e CPT=  $-2,134 \pm 0,192$  bpm/mmHg, respectivamente.  $***p<0,01$ ) com normalização deste ganho (em comparação ao grupo CON) no grupo MCT-CPT após o tratamento com captopril ( $-2,544 \pm 0,16$  vs  $-1,965 \pm 0,215$  bpm/mmHg, respectivamente.  $p>0,05$ ).



**Figura 6** – Valores da Bradicardia Reflexa Máxima (A), Taquicardia Reflexa Máxima (B), e dos Ganhos em resposta à fenilefrina (C) e em resposta ao nitroprussiato de sódio (D) dos grupos CON, MCT, CPT e MCT-CPT. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.

## 6.2 Quimiorreflexo

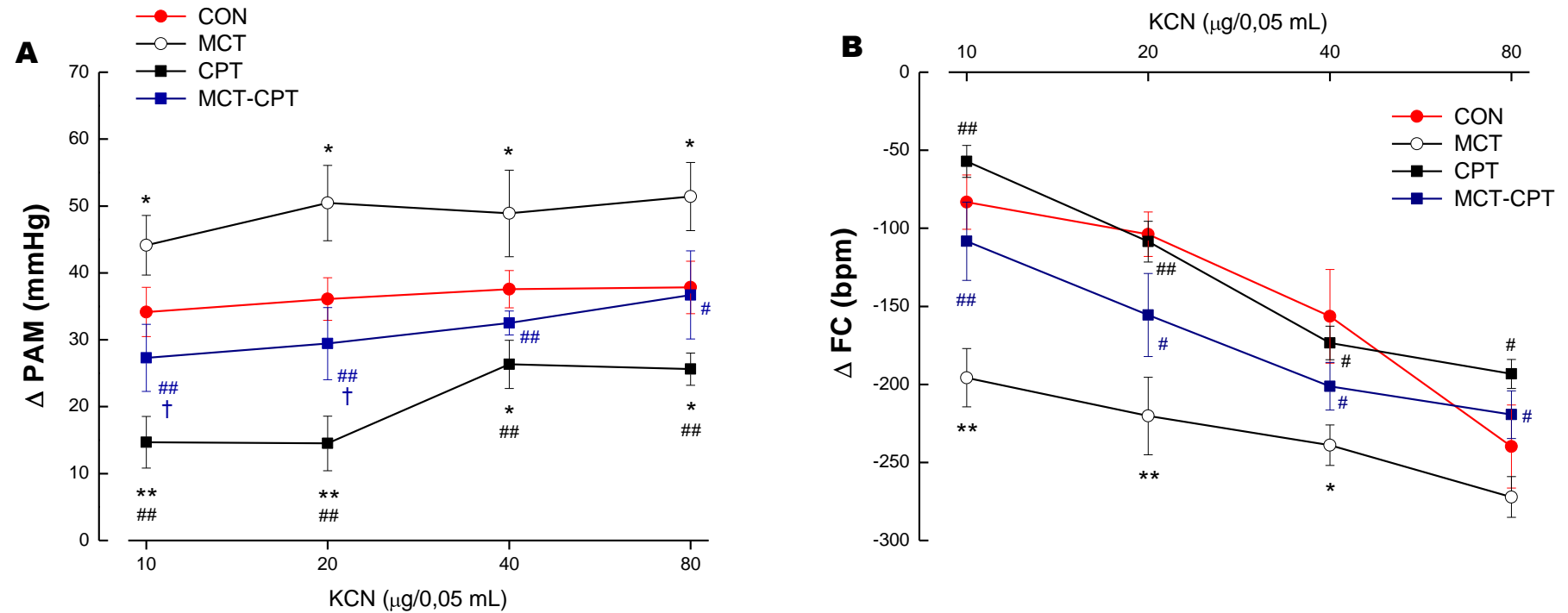
Na Figura 7 podemos visualizar as variações de PAM e FC que ocorreram em resposta à estimulação dos quimiorreceptores periféricos realizada através de doses progressivas de KCN.

No que diz respeito às variações pressóricas, podemos observar na Figura 6A que os animais do grupo MCT apresentaram uma exacerbação da resposta nas quatro diferentes doses de KCN em comparação com o grupo CON (KCN 10: MCT=  $44,14 \pm 4,46$  e CON=  $34,16 \pm 3,67$  mmHg; KCN 20: MCT=  $50,45 \pm 5,63$  e CON =  $36,1 \pm 3,19$  mmHg; KCN 40: MCT=  $48,89 \pm 6,48$  e CON=  $37,57 \pm 2,79$  mmHg; KCN 80: MCT=  $51,41 \pm 5,09$  e CON=  $37,83 \pm 3,93$  mmHg,  $*p<0,05$ ). O tratamento dos animais MCT com captopril (grupo MCT-CPT) normalizou esta resposta, tornando a respostas obtidas pelos animais nas quatro doses de KCN administradas semelhantes às respostas observadas no grupo CON (KCN 10: MCT-CPT=  $27,3 \pm 5,01$  e CON=  $34,16 \pm 3,67$  mmHg; KCN 20: MCT-CPT=  $29,43 \pm 5,45$  e CON =  $36,1 \pm 3,19$  mmHg; KCN 40: MCT-CPT=  $32,51 \pm 1,84$  mmHg e CON=  $37,57 \pm 2,79$  mmHg; KCN 80: MCT-CPT=  $36,71 \pm 6,59$  e CON=  $37,83 \pm 3,93$  mmHg,  $p>0,05$ ). Surpreendentemente, observamos ainda no grupo CPT, uma atenuação da resposta pressórica nas quatro doses de KCN tanto em comparação ao grupo MCT como em comparação ao grupo CON (grupo CPT: KCN10=  $14,69 \pm 3,85$ , KCN20=  $14,51 \pm 4,07$ , KCN40 =  $26,33 \pm 3,59$ , KCN80=  $25,61 \pm 2,42$  mmHg) e nas duas primeiras doses quando comparado ao grupo MCT-CPT ( $p<0,05^{\dagger}$ ).

Em relação à variação da FC (FC após KCN – FC repouso) em resposta às diferentes doses de KCN (Figura 7B), observamos que o grupo MCT apresentou uma maior variação nas três primeiras de KCN e não apresentou diferença na quarta dose em comparação ao grupo CON (KCN 10: MCT=  $-195,75 \pm 18,71^{**}$  e CON=



83,26  $\pm$  17,43 bpm; KCN 20: MCT= -220,24  $\pm$  24,81 bpm\*\* e CON= -103,8  $\pm$  14,22 bpm; KCN 40: MCT= -238,96  $\pm$  12,99 bpm\* e CON= -156,33  $\pm$  30,03 bpm; KCN 80: MCT= -272,14  $\pm$  13,03 bpm e CON= -239,78  $\pm$  26,66 bpm. \*p<0,05 e \*\*p<0,01). O tratamento dos animais do grupo MCT com captopril normalizou esta resposta, tornando este grupo (MCT-CPT) semelhante ao grupo CON em todas as doses de KCN aplicadas (KCN 10: MCT-CPT= -108,28  $\pm$  25,08bpm e CON= -83,26  $\pm$  17,43bpm; KCN 20: MCT-CPT= -155,6  $\pm$  26,58bpm e CON= -103,8  $\pm$  14,22bpm; KCN 40: MCT-CPT= -201,17  $\pm$  15,27 bpm e CON= -156,33  $\pm$  30,03 bpm; KCN 80: MCT-CPT= -219,37  $\pm$  15,27 bpm e CON= -239,78  $\pm$  26,66 bpm. p>0,05). Os animais do grupo CPT, embora tenham apresentado respostas semelhantes ao grupo CON após a administração das quatro doses de KCN, apresentou uma redução da resposta em comparação aos grupos tratados com MCT (grupo MCT e MCT-CPT) nas quatro diferentes doses de KCN (grupo CPT: KCN10= -57,08  $\pm$  10,23, KCN20= -108,49  $\pm$  13,05, KCN40= -173,51  $\pm$  10,73, KCN80= -193,3  $\pm$  9,36 bpm, respectivamente). Este mesmo grupo (CPT) apresentou variações de FC em resposta às progressivas doses de KCN semelhantes à obtida no grupo CON (p>0,05).



**Figura 7** – Variações da pressão arterial média (ΔPAM), (Painel A) e da frequência cardíaca (ΔFC) (Painel B) em resposta às seguintes doses de KCN: 10, 20, 40 e 80 μg/0,05mL dos grupos CON, MCT, CPT e MCT-CPT. \*\*p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. #p<0,05 e ##p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT. †p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CPT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.

### 6.3 – Reflexo Bezold-Jarisch

As variações de PAM e FC induzidas por doses progressivas de fenilbiguanida (FBG) bem como o ganho médio podem ser visualizadas na figura 8.

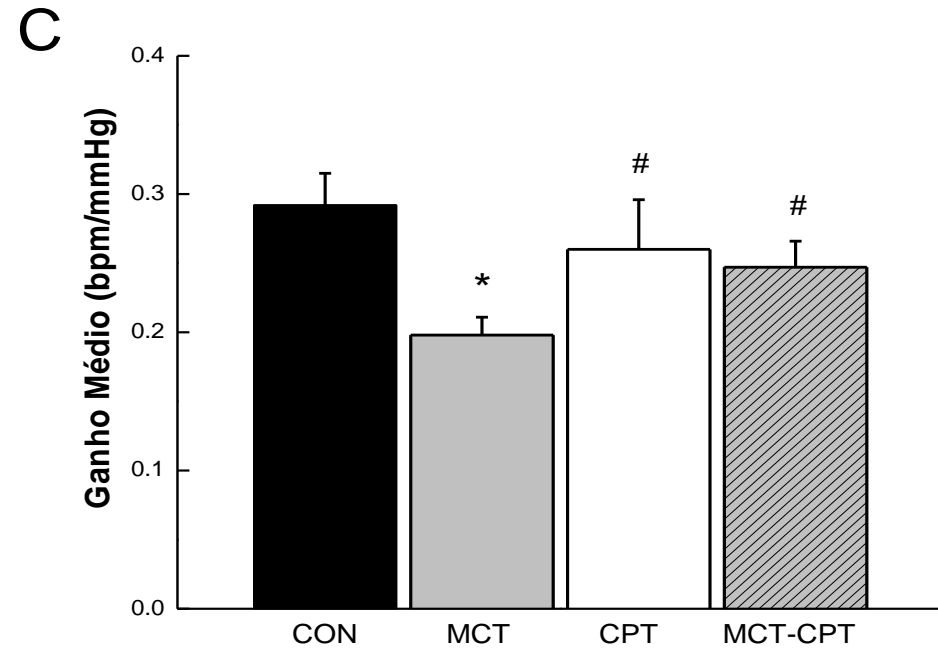
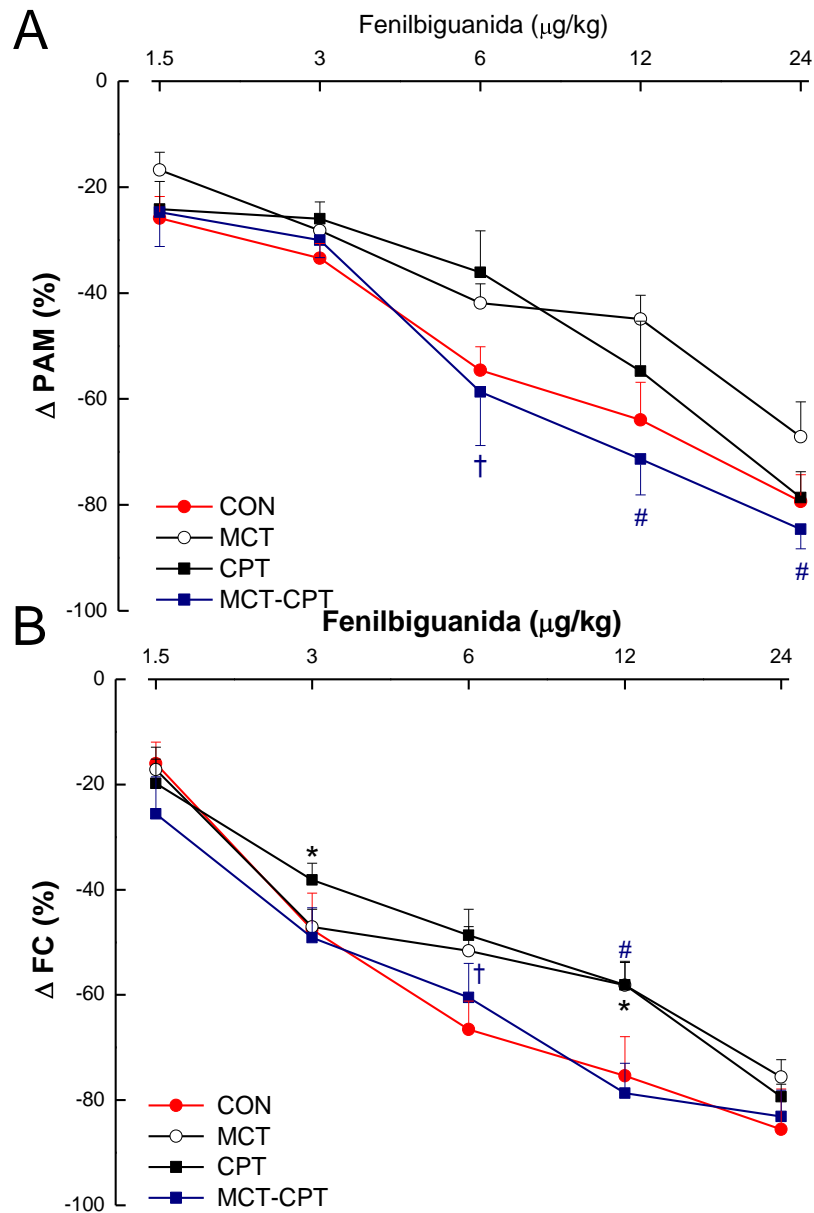
Considerando que observamos valores basais de PA discretamente diferentes entre os grupos bem como valores de FC significativamente maiores no grupo MCT em comparação com os demais grupos, optamos por realizar a análise das variações de PAM e FC em resposta às diferentes doses de FBG através da mensuração do percentual de queda destes parâmetros em comparação com os basais. A análise das variações de PAM e FC em valores absolutos também foi realizada apenas a título de complementação (vide Anexo IV).

No que diz respeito às respostas hipotensoras, não observamos nenhuma diferença entre os grupos nas menores doses de FBG (1,5 e 3 µg/Kg), enquanto na dose intermediária (6 µg/Kg) o grupo MCT-CPT apresentou uma resposta hipotensora de maior magnitude quando comparado com o grupo CPT (MCT-CPT =  $-58,66 \pm 10,15\%$  vs CPT =  $-36,10 \pm 7,84\%$ ,  $^{\dagger}p < 0,05$ ), apresentando os grupos CON, CPT e MCT respostas pressóricas semelhantes nesta dose (CON =  $-50,99 \pm 5,80\%$  e MCT =  $-40,18 \pm 4,21\%$ , respectivamente.  $p > 0,05$ ). Nas duas maiores doses de FBG, o seja, 12 e 24 µg/Kg, o grupo MCT-CPT apresentou uma resposta hipotensora de magnitude significativamente maior em comparação com o grupo MCT, sendo os demais grupos semelhantes entre si (FBG 12: CON =  $-63,93 \pm 7,09\%$ , MCT =  $-44,90 \pm 4,49\%$ , CPT =  $-54,75 \pm 9,43\%$ , MCT-CPT =  $-71,36 \pm 6,78\%$ ; FBG 24: CON =  $-79,35 \pm 5,05\%$ , MCT =  $-67,13 \pm 6,61\%$ , CPT =  $-78,63 \pm 4,90\%$ , MCT-CPT =  $-84,58 \pm 3,72\%$ ; respectivamente.  $^{\#}p < 0,05$ ).

Em relação à comparação da resposta bradicárdica, na dose de 1,5 µg/Kg não foram encontradas diferenças na análise inter-grupos. Na dose de 3 µg/Kg, o

grupo CPT apresentou uma redução da resposta em comparação com o grupo CON, sendo observadas respostas semelhantes nos demais grupos (FBG 3: CON=  $-47,59 \pm 6,95\%$ , MCT=  $-47,09 \pm 3,36\%$ , CPT=  $-38,12 \pm 3,16\%^*$ , MCT-CPT=  $-49,14 \pm 5,70\%$ ;  $*p<0,05$ ). Na dose de 6  $\mu\text{g/Kg}$ , o grupo MCT-CPT apresentou uma queda de FC de maior magnitude que o grupo CPT (MCT-CPT=  $-60,49 \pm 6,51\%^{\dagger}$ , CPT=  $-48,66 \pm 4,96\%$ ;  $^{\dagger}p<0,05$ ), não sendo observadas outras diferenças significativas entre os grupos nesta dose (CON=  $-66,56 \pm 5,40$  vs MCT=  $-51,64 \pm 4,62\%$ , respectivamente.  $p<0,05$ ). Na dose de 12  $\mu\text{g/Kg}$ , o grupo CPT apresentou uma menor resposta bradicárdica em comparação com o grupo CON (CON =  $-75,40 \pm 7,46$  vs CPT=  $-58,10 \pm 4,27\%^*$ , respectivamente.  $*p<0,05$ ), enquanto o grupo MCT-CPT apresentou uma maior resposta bradicárdica em comparação com o grupo MCT ( $-78,66 \pm 5,68$  vs  $-58,17 \pm 4,57\%$ , respectivamente.  $^{\#}p<0,05$ ). Na análise da resposta à maior dose de FBG avaliada (24  $\mu\text{g/Kg}$ ), não foram observadas diferenças na magnitude da bradicardia entre os grupos.

Além das respostas bradicárdicas e hipotensoras, avaliamos o ganho médio obtido considerando as cinco diferentes doses de FBG empregadas. Através desta análise, pudemos observar uma atenuação significativa do ganho no grupo MCT em comparação com os demais grupos de estudo (CON=  $0,29 \pm 0,02$ , MCT=  $0,20 \pm 0,01^*$ , CPT=  $0,26 \pm 0,04^{\#}$ , MCT-CPT=  $0,25 \pm 0,02^{\#}$  bpm/mmHg.  $*p<0,05$ ;  $^{\#}p<0,05$ ).

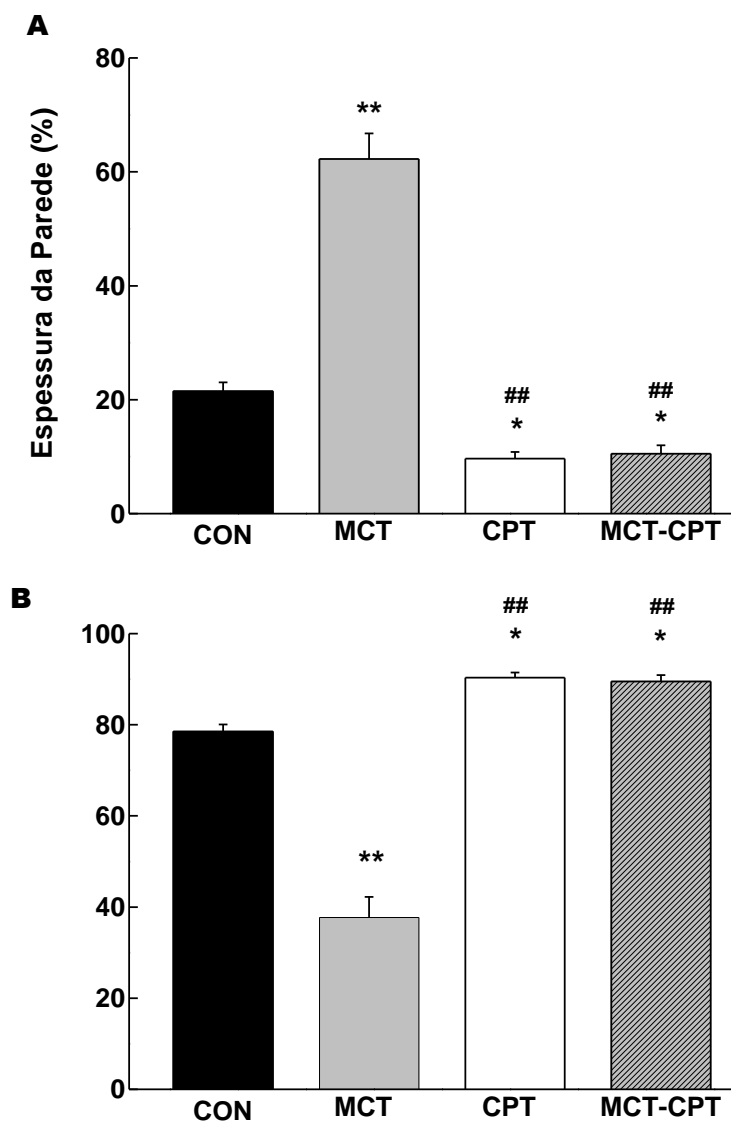


**Figura 8** – Variações percentuais da pressão arterial média (PAM) (painel A) e da frequência cardíaca (FC) (painel B) em resposta às diferentes doses de FBG: 1,5 $\mu\text{g/Kg}$ , 3 $\mu\text{g/Kg}$ , 6 $\mu\text{g/Kg}$ , 12 $\mu\text{g/Kg}$  e 24 $\mu\text{g/Kg}$ , e ganho médio (painel C) dos grupos CON, MCT, CPT e MCT-CPT. \* $p < 0,05$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT. † $p < 0,05$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CPT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher. # $p < 0,05$ .

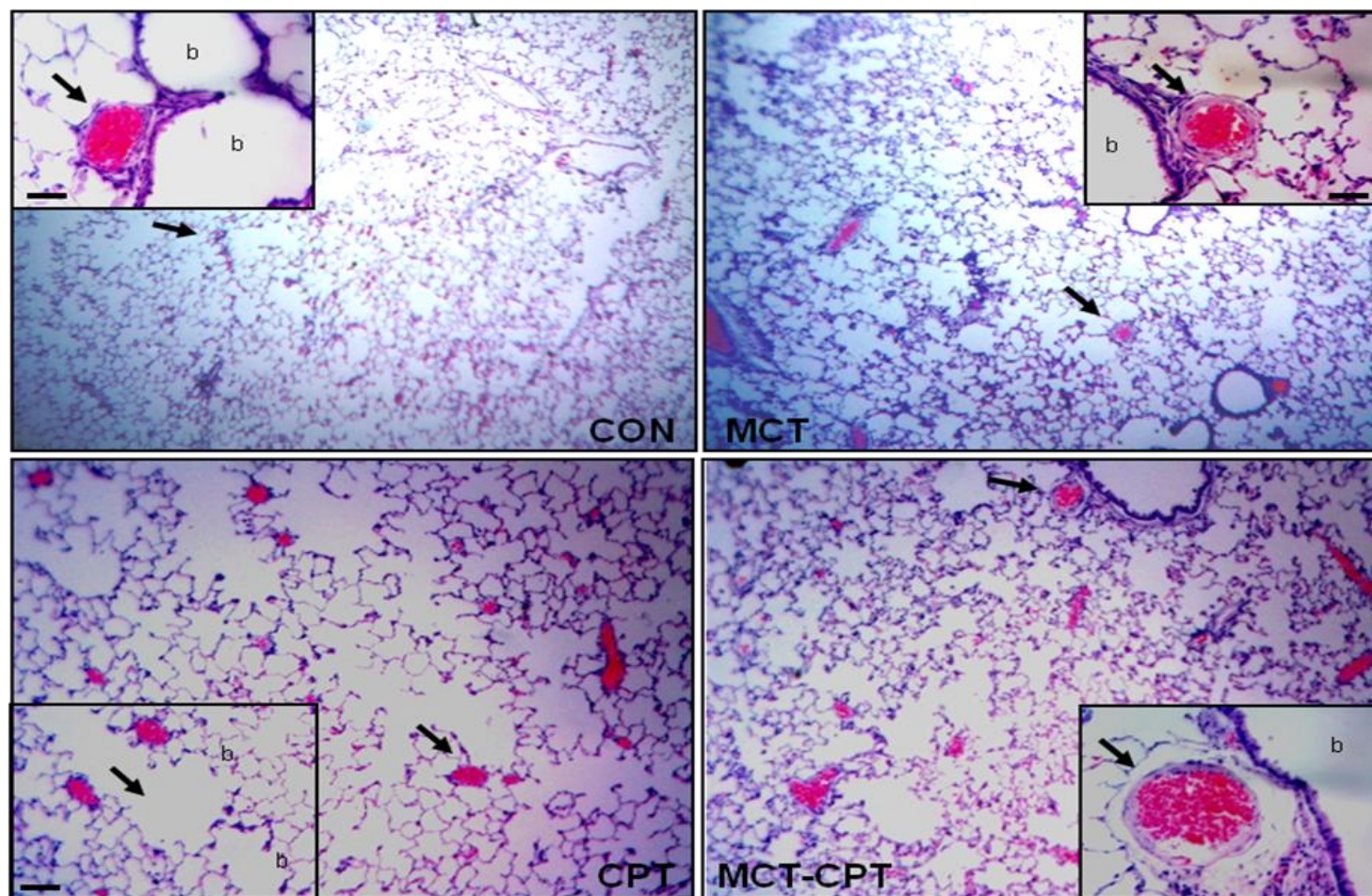
## 7.0 – Avaliação Histológica

Além dos parâmetros funcionais da instalação da HAP, nosso estudo também avaliou parâmetros morfométricos através da análise microscópica de cortes pulmonares. Conforme podemos visualizar nas Figuras 9 e 10, o tratamento com MCT promoveu uma significativa hipertrofia da camada média dos ramos distais das arteríolas pulmonares em comparação ao grupo CON, uma vez que a espessura da parede vascular do grupo MCT foi aproximadamente três vezes maior que a espessura do grupo CON ( $62,28 \pm 4,48$  vs  $21,49 \pm 1,54$ ; respectivamente.  $**p < 0,01$ ), o que foi acompanhado de uma redução também significativa do lúmen destas arteríolas (MCT =  $37,72 \pm 4,48\%$  vs CON =  $78,50 \pm 1,54\%$ ,  $**p < 0,01$ ). Quando os animais com HAP foram tratados com captopril (grupo CPT-MCT), ocorreu não apenas uma redução da espessura da parede em relação ao grupo MCT ( $10,52 \pm 1,45\%$  vs  $62,27 \pm 4,48\%$ , respectivamente,  $^{##}p < 0,01$ ), mas também tornou a parede arteriolar destes animais menos espessa que a parede dos animais do grupo CON (grupo MCT-CPT =  $10,52 \pm 1,45\%$ , grupo CON =  $21,49 \pm 1,54\%$ ,  $*p < 0,01$ ), e com espessura semelhante ao grupo CPT ( $10,52 \pm 1,45\%$  vs  $9,67 \pm 1,16\%$ ; respectivamente.  $p > 0,05$ ). Resultados semelhantes foram observados em relação ao lúmen vascular, uma vez que estes parâmetros (lúmen e espessura) estão inversamente associados. Os animais tratados com monocrotalina e captopril (grupo MCT-CPT), não apenas apresentaram uma melhora significativa do lúmen em comparação com grupo MCT ( $89,47 \pm 1,45$  vs  $37,72 \pm 4,48\%$ , respectivamente  $^{##}p < 0,01$ ), mas também evidenciaram um aumento do lúmen em comparação com o grupo CON (grupo MCT-CPT =  $89,47 \pm 1,45\%$ , grupo CON =  $78,50 \pm 1,54\%$ ,  $*p < 0,01$ ). O mesmo foi observado em relação ao lúmen do grupo CPT, ou seja, um aumento em comparação tanto com o grupo MCT ( $^{##}p < 0,01$ ) quanto em comparação com o

grupo CON (\* $p < 0,05$ ), sendo semelhante ao grupo MCT-CPT (lúmen do grupo CPT =  $90,33 \pm 1,16\%$ .  $p > 0,05$ ).



**Figura 9** – Valores da espessura da parede muscular em porcentagem (A) e do lúmen arteriolar em porcentagem (B) dos grupos CON, MCT, CPT e MCT-CPT. \*\* $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.



**Figura 10** – Visualização da hipertrofia da camada média dos ramos musculares da artéria pulmonar junto a bronquíolos, em ratos tratados com dose única (60 mg/kg) de MCT e eutanasiados três semanas após o tratamento, e redução da hipertrofia após o tratamento com captopril (grupo MCT-CPT), tornando a espessura da parede semelhante à observada no grupo CON. (Coloração: hematoxilina e eosina).



## **DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que o tratamento com MCT levou a instalação de um quadro típico de HAP, que foi caracterizada por elevação do Índice Pulmonar, elevação das pressões de ventrículo direito ( $P_{smáx}$  de VD, PDF de VD), elevação da FR e  $V_c$ , prejuízo das trocas gasosas (hipóxia associada à hipercapnia), disautonomia (hiperatividade simpática e atenuação da atividade parassimpática), alterações morfométricas (hipertrofia da camada média das arteríolas pulmonares e redução do lúmen) e alteração dos reflexos cardiovasculares (quimiorreflexo, barorreflexo e reflexo Bezold-Jarisch). A inibição do SRA através do tratamento com captopril surpreendentemente reverteu as alterações acima relatadas, possibilitando a normalização das alterações morfológicas, respiratórias, hemodinâmicas, cardiovasculares reflexas e autonômicas. O importante papel do quimiorreflexo nesta doença foi ressaltado neste estudo, cujo tratamento com captopril além de normalizar sua atividade nos animais submetidos a HAP (grupo MCT-CPT), também atenuou suas respostas nos animais não submetidos a HAP (grupo CPT).

### 1.0– Avaliação hemodinâmica

O modelo de HAP proposto para o presente estudo foi o de MCT. Após três semanas da administração subcutânea de MCT, os animais apresentaram significativas alterações hemodinâmicas, caracterizadas por quadro de taquicardia sem alteração da PAM, elevação significativa da pressão sistólica de VD, sem alterações significantes da pressão sistólica de VE e medidas derivadas.

O mecanismo de ação pelo qual a MCT promove o desenvolvimento instalação da HAP foi anteriormente estudado (Daicho et al., 2009; Ludke et al., 2010). Sabe-se que a MCT é um alcalóide obtido das sementes da *Crotalaria spectalalia*, que requer metabolização hepática e, através da bioativação do citocromo p-450, é transformada em dihidro-monocrotalina (DHM), um alcalóide pirrolizidínico. Este, por sua vez, inibe a atividade da NADH-desidrogenase, com consequente redução dos níveis de ATP. Contudo, a DHM é um alcalóide que apresenta efeitos tóxicos, tanto hepáticos, como cardiovasculares em muitos animais, tais como ruminantes roedores e até mesmo o homem (Mingatto et al., 2008).

Vários estudos, como os de Farhat et al. (1993), Jasmin et al. (2001), Okada et al. (2008) e Daicho et al. (2009), mostraram que a MCT promove lesão endotelial vascular direta e inflamação dos vasos pulmonares, ocasionando um aumento da resistência arterial pulmonar, acarretando mais tardiamente, fibrose e disfunção cardíaca. Entretanto, alguns autores afirmam que a inflamação da adventícia acompanhada de acúmulo principalmente de macrófagos, tem efeitos mais relevantes sobre a patogênese da HAP do que as lesões endoteliais (Wilson et al., 1989; Stenmark et al., 2006).

Estudos prévios apontam também para uma importante participação do SRA no desenvolvimento da HAP neste modelo. Estudos de Kay et al. (1982) relataram que entre 10 e 14 dias após a administração de MCT ocorre uma inibição da atividade da ECA acompanhada por redução da conversão de angiotensina I para All. Estudos de Molteni et al. (1984), mostraram ainda um aumento transitório na atividade da ECA pulmonar após uma semana de tratamento com MCT, porém seguido por uma persistente redução entre 2 a 6 semanas de tratamento. Estes

autores acreditam que esta elevação transiente da atividade da ECA precede o remodelamento vascular e reflete a lesão e a disfunção endotelial. Posteriormente, Hoorn e Roth (1993) concluíram que a redução da atividade da ECA endotelial provavelmente não é um efeito direto da MCT sobre esta enzima, e sim, uma reflexão da lesão celular resultante da exposição a este composto.

Mais recentemente, Marshal et al. (2003) sugeriram que, não apenas em modelos de HAP, mas também em diversos modelos de lesão pulmonar, tais como modelos de fibrose pulmonar idiopática, silicose e asbestose, existe a descrição de elevação dos níveis plasmáticos da ECA, o que vem a reforçar a participação do SRA em doenças pulmonares.

Embora o mecanismo pelo qual a MCT leve ao desenvolvimento da HAP ainda não esteja totalmente esclarecido, é consenso que este modelo leva ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e disfunção significativa de ventrículo direito, o que é indispensável para o estudo desta doença.

No estudo realizado por Ludke et al. (2010), os animais que receberam uma injeção intraperitoneal de dose única de MCT apresentaram alterações hemodinâmicas semelhantes às observadas no presente estudo, ou seja, aumentos significantes das pressões ventriculares direita sem modificações da PA sistêmica média.

Entretanto, no estudo de Lourenço et al. (2006), os animais tratados com MCT apresentaram não apenas aumento das pressões ventriculares direita mas também redução dos índices de contratilidade e relaxamento de VE, sugerindo uma falência desta câmara, o que pode ter ocorrido devido ao tempo de instalação da HAP, uma vez que os animais foram avaliados 6 semanas após a injeção de MCT, ou seja, encontravam-se em um estágio mais avançado da doença do que os

animais avaliados no presente estudo. Segundo estes autores, a evolução para insuficiência cardíaca esquerda em um estágio avançado da doença, decorre do fato que, embora apenas o ventrículo direito sofra sobrecarga, ambos os ventrículos estão expostos a uma maior estimulação neuroendócrina, uma vez que estes animais apresentaram um aumento da expressão da ECA, da ET-1 e do peptídeo natriurético tipo B (BNP).

Embora não tenhamos realizado a dosagem destes fatores neuroendócrinos, acreditamos que, assim como no estudo de Lourenço et al. (2006), a expressão da ECA pode estar elevada nos animais do grupo MCT em nosso estudo, visto que a inibição desta enzima através do captopril ocasionou melhoras significantes destes animais.

Para explicar a elevação da FC observada nos animais tratados apenas com MCT algumas hipóteses devem ser consideradas, tais como: a ocorrência de hipóxia crônica, a hiperatividade quimiorreflexa e consequente aumento da frequência respiratória, a elevação da atividade simpática e a atenuação do barorreflexo, bem como a interação entre estes fatores.

No que diz respeito à hipóxia, tal como a observada no grupo MCT, devem ser consideradas as importantes disfunções que esta promove sobre o sistema endotelial, principalmente o pulmonar. O endotélio vascular pulmonar possui um importante papel na patogenia da HAP devido ao seu envolvimento no processo vaso-oclusivo propriamente dito (Larumbe e Escoboza, 1994). Sabe-se que as células endoteliais pulmonares podem responder de diferentes maneiras a diferentes injúrias, dentre elas a hipóxia, o estresse de cisalhamento, a inflamação, toxinas ou drogas, resultando em proliferação endotelial anormal e posteriormente na formação de lesões plexiformes (Cool et al., 1999).

Apesar da hipóxia não ser um dos principais fatores para o desenvolvimento inicial da HAP, ela pode contribuir para o remodelamento vascular pulmonar durante a progressão da doença (hipóxia crônica) e/ou causar vasoconstrição pulmonar (hipóxia aguda) (Hardingham et al., 1997; Sweeney e Yuan, 2000). Contudo, também ocorrem alterações das funções homeostáticas endoteliais, tais como as vias de coagulação e produção de fatores de crescimento e agentes vasoativos (Le et al., 1998). Estudos prévios demonstraram um aumento na produção de tromboxano e uma diminuição na formação de prostaciclina (PGI) em pacientes com HAP (Christman et al., 1992); redução da expressão da  $\text{PGI}_2$  sintase em arteríolas pulmonares (Tuder et al., 1999); redução da expressão da NO-sintase (McQuillan et al., 1994; Giadid e Saleh, 1995); aumento da expressão de ET-1 (Giaid et al., 1993; Davie et al., 2002); aumento do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e de seus receptores pulmonares (Cool et al., 1999; Taraseviciene-Stewart et al., 2001) e um aumento do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Hirose et al., 2000). Estas alterações levam a um aumento do tônus vascular, resultando em um aumento da PA pulmonar e, conseqüentemente, provocando maior dano endotelial. Por outro lado, a ocorrência da hipóxia e a sua manutenção levam a ativação de mecanismos reflexos periféricos de controle ventilatório, tal como o quimiorreflexo, que apresentou uma resposta exacerbada nos animais com HAP em nosso estudo. A ativação quimiorreflexa, além de aumentar a FR, promove hiperatividade simpática. Esta, por sua vez, promove inotropismo e cronotropismo positivos, podendo resultar em aumento da PA e da FC (Marshall et al., 2000; Haibara et al., 2002). Em adição, não podemos descartar a possível participação dos quimiorreceptores centrais, os quais são ativados de forma mais importante em situações de hipercapnia (Marshall, 1987).

De fato, nossos resultados mostraram através de bloqueios autonômicos com atenolol e metil-atropina, que houve um predomínio do componente autonômico simpático em detrimento do componente parassimpático. É sabido que a estimulação da inervação simpática-cardíaca promove aumento da FC através da estimulação dos adrenoreceptores  $\beta_1$ . Em adição, a disfunção barorreflexa observada no grupo MCT pode também ter contribuído com este achado, uma vez que, de acordo com Mostarda et al. (2011), a atenuação deste reflexo tem como uma das consequências a elevação da atividade nervosa simpática.

Acreditamos que a elevação da frequência respiratória associada ao aumento da atividade quimiorreflexa pode também ter sido um dos fatores responsáveis pela elevação da FC no grupo MCT. A modulação de parâmetros cardiovasculares pelo sistema respiratório tem sido proposta por vários investigadores nas últimas décadas. Em 1871, Hering demonstrou através de um estudo experimental em cães que a insuflação pulmonar produz taquicardia. Isto se deve à ativação de receptores de estiramento localizados na musculatura lisa das vias aéreas, os quais, quando ativados, enviam potenciais de ação ao sistema nervoso central, por meio de fibras vagais do tipo A, promovendo taquicardia por uma inibição da atividade eferente vagal (Zin, 1991).

Outra associação que deve ser ressaltada diz respeito aos efeitos da hipóxia sobre o SRA, bem como sobre o corpúsculo carotídeo, localizado nas bifurcações carotídeas, onde ocorre a transdução de sinais para a ativação dos quimiorreceptores periféricos. Segundo estudos de Adamy et al. (2002), a hipóxia promove uma super-expressão dos receptores  $AT_1$  no coração, a qual também medeia a resposta inotrópica positiva e contribui para o aumento dos parâmetros hemodinâmicos encontrados no presente estudo. Desta forma, acreditamos que a

interação destes fatores em associação com a atenuação da atividade barorreflexa e exacerbação quimiorreflexa observadas, que sabidamente causam taquicardia reflexa, pode justificar a significativa elevação da FC nestes animais do grupo MCT.

O desenvolvimento e a utilização de modelos adequados de HAP, tal como o da MCT, nos permitiu investigar se o captopril, uma droga inibidora do SRA, é eficaz em reverter o quadro da HAP. É sabido que o captopril atua inibindo a ECA, e consequentemente, inibindo a formação de All. Observamos no presente estudo que os animais *Wistar* submetidos à HAP e tratados com esta droga, tiveram seus parâmetros hemodinâmicos normalizados.

Em 1960, o estudo de Segel et al. já atribuía à All uma potente ação vasoconstritora pulmonar. Corroborando com estes estudos, Lipworth et al. (1994), mostrou que a infusão de All no leito vascular pulmonar promove um aumento da PAM pulmonar de forma dose-dependente. Ainda segundo estes estudos, o aumento da resistência vascular pela All é significativamente mais pronunciado ao nível pulmonar do que sistemicamente, sugerindo que o leito pulmonar responde mais intensamente aos efeitos vasoconstritores da All.

Acredita-se que a All tenha forte participação no processo de remodelamento vascular pulmonar, visto que em animais com HAP hipóxica, Marshal (2003) observou uma maior expressão de All, a qual promoveu a muscularização das arteríolas pulmonares, com consequente diminuição do seu lúmen.

Corroborando com Marshal (2003), os estudos de Chassagne et al. (2000) mostraram que a All tem uma significativa participação na hipertrofia da camada média das artérias pulmonares induzida por HP hipóxica em ratos. Estes autores acreditam que esta resposta é mediada principalmente pelo receptor AT1, uma vez



que o tratamento dos animais com losartan, que é um antagonista de receptor AT1 reverteu totalmente a muscularização dos vasos pulmonares, enquanto o tratamento com uma droga antagonista de receptor AT2, não alterou a hipertrofia vascular pulmonar instalada nos animais após três semanas de hipóxia crônica. Além disso, estes autores observaram que a resposta vasoconstritora pulmonar observada em animais com altos níveis de All também normalizou apenas quando os animais receberam losartan. Em adição, Lam et al. (2003), observaram a ocorrência de um pequeno porém significativo aumento da expressão de RNA mensageiro da ECA em ratos submetidos a hipóxia crônica durante 4 semanas.

Sabendo-se que as consequências hemodinâmicas da HAP são desencadeadas pelas alterações vasculares pulmonares e baseando-se nas evidências científicas da participação do SRA neste processo de remodelamento, acreditamos que o tratamento dos nossos animais com captopril foi responsável pela normalização das pressões de ventrículo direito dos animais com HAP em nosso estudo.

A utilização de drogas que bloqueiem o SRA como uma alternativa terapêutica para o tratamento da HAP tem sido estudada por vários investigadores, tanto ao nível experimental (Qing et al., 1992; Bolterman et al., 2005, Xie et al., 2010), quanto clinicamente em humanos (Rich et al., 1982; Leier et al., 1983).

Estudos de Horowitz et al. (1981) mostraram que a administração de pequenas doses de captopril pode melhorar o quadro hemodinâmico do paciente com HAP, ao promover queda da resistência vascular pulmonar, melhorando inclusive a hipoxemia. Da mesma forma, os estudos experimentais de Okada et al. (2008), mostraram que o captopril atenuou a hipertrofia ventricular induzida pela MCT em ratos. Estudos de Morrel et al. (1995) haviam mostrado que o tratamento

com captopril melhorava a pressão média de artéria pulmonar e revertia as alterações histológicas de ratos tratados com MCT. Mais recentemente, Xie et al. (2010) mostraram que o tratamento de ratos MCT com losartan não apenas reduziu a pressão média da artéria pulmonar e a hipertrofia de VD, mas também melhorou as alterações histológicas sugerindo que esta droga é capaz de reverter o processo de remodelamento vascular pulmonar. Neste mesmo ano, estudos de Molthen et al. (2010) relataram um aumento significativo da distensibilidade arterial associado à diminuição da resistência vascular pulmonar em ratos com HAP induzida por MCT tratados com captopril.

Entretanto, os resultados obtidos por estes estudos ainda são bastante divergentes. Alguns demonstraram que estas drogas não são eficazes no tratamento da HAP por não serem capazes de reduzir a pressão na artéria pulmonar (Leier et al, 1983; Cassis et al., 1992; Suylen et al., 1998). Achados semelhantes foram obtidos por Rich et al. (1982), que também não observaram melhora da PA pulmonar, tanto em repouso como durante exercício físico, em quatro pacientes com HAP submetidos ao tratamento prolongado com captopril. Ao nível experimental, Cassis et al. (1992) e Kreutz et al. (1996) mostraram que o tratamento com losartan em ratos com HAP induzida pela MCT falhou em reduzir a PA pulmonar.

Esta grande controvérsia quanto ao valor terapêutico destas drogas para tratamento da HAP observada tanto entre os estudos clínicos como nos experimentais, pode ser atribuída, pelo menos em parte, às diferenças metodológicas encontradas. Não existe uma padronização a respeito da dosagem ideal de cada droga inibidora do SRA nos diferentes modelos de HAP. Além disso, embora os diferentes subtipos de HAP apresentem características vasculares e

hemodinâmicas semelhantes, o mecanismo de desenvolvimento da doença é variável e, desta forma, a resposta às diferentes terapêuticas pode também diferir.

Apesar desta divergência, observamos que a grande maioria dos estudos experimentais que realizou tratamento de animais MCT com captopril obteve resultados favoráveis, enquanto em humanos encontramos poucos trabalhos que descreveram uma melhora significativa de pacientes com HAP tratados com esta droga. Um estudo realizado por Metzger et al. (2011) poderia ajudar a esclarecer esta questão. Segundo estes autores, nos ratos há uma grande e homogênea expressão da ECA em quase todas as artérias de médio e grande calibre, incluindo a artéria pulmonar, enquanto nos humanos esta distribuição é mais heterogênea, sendo a maior expressão da ECA observada na microcirculação, enquanto em artérias de grande calibre como as pulmonares os níveis são reduzidos. Em adição, conforme citado anteriormente nesta discussão, existem evidências científicas de que a atividade da ECA está aumentada no modelo MCT, o que ressalta a relevância do tratamento destes animais com inibidores desta enzima.

Embora o estudo dos efeitos anti-remodelamento vascular resultantes da inibição do SRA através do captopril seja de suma importância para esta pesquisa, outros importantes efeitos decorrentes da inibição das ações da AII não podem ser descartados, tais como a diminuição da liberação de vasopressina, inibição da ação simpatomimética central, inibição da sede e do apetite ao sal (Bader, 2010).

Outro mecanismo importante e que deve ser considerado na reversão do quadro de HAP pelo captopril no presente estudo está relacionado à própria modulação da via angiotensinérgica. Com a inibição da ECA pelo captopril, há uma maior formação de Angiotensina 1-7, que tem um importante efeito vasodilatador pulmonar, uma vez que aumenta a vasodilatação induzida por bradicinina através da

liberação de óxido nítrico e produtos da ciclo-oxigenase (COX), cuja resposta é mediada pelo receptor MAS (Maia et al., 2004). A angiotensina 1-7 possui também os seguintes efeitos: anti-hipertrófico, anti-fibrótico e anti-trombótico. Contudo, experimentos adicionais são necessários para avaliarmos o papel relativo destes receptores na mediação desta resposta vasodilatadora pulmonar, bem como no tratamento da HAP.

Acreditamos que as melhoras obtidas nos animais com HAP tratados com captopril no presente estudo podem ter decorrido não apenas da inibição do SRA, mas também de outro mecanismo farmacológico. Estudos de Fernandes et al. (1996) e Pechanova (2007), mostraram a existência de um radical denominado “tiol” no captopril, que é um potente “sequestrador” de radicais livres. Segundo DeMarco et al. (2010), no modelo de HAP induzido por MCT ocorre uma rápida resposta inflamatória com presença de níveis elevados de superóxidos. Estes, por sua vez, podem promover danos celulares e teciduais, devido à oxidação dos constituintes celulares. Este estresse oxidativo pode acarretar aterosclerose, insuficiência cardíaca, hipertrofia ventricular, distúrbios respiratórios e hipertensão sistêmica e pulmonar. Assim, o uso de drogas antioxidantes, tal como os miméticos da superóxido dismutase e as drogas que apresentam radical “tiol”, seriam capazes de atenuar tanto a hipertrofia ventricular direita, quanto às pressões vasculares pulmonares destes animais.

Baseando nestas evidências científicas, acreditamos que os favoráveis resultados por nós obtidos após o tratamento da HAP com captopril podem decorrer tanto da inibição do SRA e da reversão das consequências da hiperatividade deste sistema como do efeito antioxidante desta droga devido a presença do radical “tiol”. Recentemente, estudos de Petrov et al. (2012), mostraram em preparações *in vitro*

que o captopril na concentração de 9.34mM é um potente “sequestrador” de radicais livres.

Esta hipótese vem a ser reforçada pelo estudo de Yu-Hui Liu et al. (2006) que através da análise da peroxidação do endotélio de camundongos, mostraram a eficácia do captopril na redução dos radicais livres endoteliais, enquanto que o tratamento com enalapril (que não possui o radical “tiol”) não apresentou este efeito protetor. Estes autores também mostraram, através de curvas de relaxamento de anéis isolados de aorta com lesão endotelial com acetilcolina, que os animais tratados com captopril apresentaram porcentagens de relaxamento mais significativas que o enalapril. Isto ressalta novamente a importância deste radical.

Estudos de Pechànova (2007), em ratos espontaneamente hipertensos tratados com captopril, mostraram que a inibição da ECA foi capaz de prevenir a hipertensão arterial sistêmica (HAS) por dois mecanismos: através do aumento da atividade da oxido nítrico sintase e por redução simultânea do stress oxidativo, que resultou num aumento da concentração de GMPc. Quanto à HAP, DeMarco et.al. (2010) relataram que o stress oxidativo tem um importante papel na patogênese desta doença, sugerindo a utilização de drogas anti-oxidantes.

Possivelmente, outros modelos de HAP podem também ser beneficiados com os efeitos antioxidantes desta droga (captopril), uma vez que há descrição de altos níveis de radicais livres em diversos outros modelos desta doença (DeMarco et al., 2010).

Por outro lado, a presença do radical “tiol” suscitou a possibilidade de a HAP ser tratada apenas com drogas antioxidantes. Recentemente, estudos de Csiszar et al. (2009) induziram HAP em ratos através da MCT e submeteram os animais ao tratamento com resveratrol (3,5,4\_-trihydroxystilbene) por 14 e 21 dias, o qual

pertence a uma nova classe de drogas que possuem efeitos citoprotetor, anti-oxidante e propriedades vasoprotetoras anti-inflamatórias. Os resultados destes estudos mostraram que o resveratrol promoveu uma melhora da função endotelial, atenuou o estresse oxidativo, inibiu a inflamação e o remodelamento vascular pulmonar e, conseqüentemente, preveniu o desenvolvimento da HAP. Estes resultados sugerem que o uso de drogas anti-oxidantes poderia ser útil para a prevenção da HAP, porém permanece por ser esclarecido se seria eficaz para o tratamento da HAP após a sua instalação, tal como realizado em nosso protocolo experimental. Neste contexto, poderia ser sugerido que a presença do radical “tiol” na molécula de captopril pode vir a ser um coadjuvante importante para o tratamento de HAP.

Outro mecanismo farmacológico decorrente do tratamento com captopril que deve ser ressaltado se refere à bradicinina, que é um potente vasodilatador derivado do endotélio com meia vida de aproximadamente 15 segundos sendo então degradada rapidamente pela ECA (Cockcroft, 1994; Kuga, 1997). A ECA degrada 95% da bradicinina quando a mesma passa pela circulação pulmonar (Bonner, 1992) e a administração de bradicinina exógena induz queda da resistência nas arteríolas humanas devido, em parte ao óxido nítrico, e em parte ao fator despolarizante do endotélio (Kuga, 1997; Honing, 2000). Pacientes com HAS apresentaram maiores efeitos dos inibidores de ECA quando os mesmo receberam bradicinina exógena (Bonner, 1992), fato este que sugere que o efeito hipotensor dos inibidores de ECA é em parte gerado pelo aumento da bradicinina, que aumenta suas concentrações plasmáticas pela degradação da ECA.

A bradicinina também apresenta uma importante função sobre o tônus vascular, sendo um potente vasodilatador na circulação sistêmica (Olson et al.,

2009). Estudos prévios mostraram também uma importante regulação do tônus vascular pulmonar pelo receptor de bradicinina. Estudos de Taraseviciene-Stewart et al. (2005), através da avaliação dos efeitos da administração de um agonista de bradicinina em ratos com HAP severa, observaram uma significativa redução da pressão na artéria pulmonar, da hipertrofia do VD e das lesões plexiformes, sugerindo um importante efeito modulador da função endotelial e cardioprotetor deste peptídeo.

Acreditamos que, em nosso estudo, a melhora obtida nos animais MCT após o tratamento com captopril pode ter decorrido de diferentes efeitos terapêuticos desta droga, o que corrobora com os estudos de Kanno et al. (2001), visto que os autores observaram que o tratamento de animais MCT com enalapril, uma droga inibidora da ECA, não apenas preveniu a formação de AI, mas também aumentou os níveis de bradicinina e a liberação de óxido nítrico derivado do endotélio vascular.

Em relação à análise dos níveis pressóricos sistêmicos (medidas de PAM), estes foram semelhantes nos quatro grupos de estudos. Considerando que os animais com HAP (grupo MCT) apresentaram níveis elevados de FC e aumento da atividade autonômica simpática, esperávamos que estes aumentos refletissem em uma elevação da PAM nos animais do grupo MCT, fato este que não foi observado. Sabendo-se da interdependência das câmaras cardíacas direita e esquerda (Enomoto e Harder, 2010), acreditamos que o aumento da resistência vascular pulmonar e consequente aumento da pressão atrial e ventricular direita podem ter reduzido o retorno venoso para estas câmaras cardíacas. De acordo com estudos de Michard (2005), a redução da pré-carga ventricular direita reduz o débito ejetado por esta câmara, o que consequentemente reduz o fluxo sanguíneo para as artérias pulmonares, a pressão de enchimento de VE e o volume sistólico ejetado por esta

câmara. Assim, uma frequência de batimentos cardíacos aumentada em associação com um menor volume sistólico ejetado poderia resultar em uma PA inalterada. Porém, não podemos confirmar esta hipótese em nosso estudo, visto que os volumes sistólicos ventriculares não foram mensurados.

Além disso, outro possível mecanismo para explicar a ocorrência de taquicardia sem hipertensão concomitante nos animais do grupo MCT está associado com a hipoxemia apresentada por estes animais. Sabidamente, ao contrário do que acontece na vasculatura pulmonar, a presença de hipoxemia arterial promove dilatação compensatória das arteríolas para aumentar o fluxo sanguíneo para os tecidos. Para que esta resposta à hipoxemia arterial ocorra, existem vários mecanismos adaptativos moleculares e celulares, que podem envolver a geração de ROS (espécies reativas de oxigênio) e derivados de ROS mitocondrial, de Nox (NADPH oxidase), dentre outros, além de respostas adaptativas à hipóxia crônica, tais como alterações na proliferação celular, condutância iônica e na resposta contrátil ao cálcio (Paffett e Walker, 2007). Assim, certa diminuição da PA diastólica poderia ser observada em consequência desta queda de resistência periférica, contrabalanceando a resposta hipertensora associada ao aumento da atividade simpática e da FC. Assim, considerando que os animais tratados somente com MCT apresentaram tanto fatores hipertensores como hipotensores, acreditamos que o balanço destes parâmetros possibilitou a manutenção da PAM dentro da normalidade.

Em adição, embora existam relatos na literatura de efeitos hipotensores do uso de captopril tanto em ratos normotensos (Maia et al., 2004) como em humanos com HAP (Talantbek et al., 1996; Puri et al., 2007), não observamos este efeito, uma vez que todos os animais tratados com esta droga apresentaram níveis de PAM



semelhantes aos animais do grupo controle. Não há um consenso na literatura sobre este efeito hipotensor desta droga, uma vez que no estudo realizado por Shin et al. (2009), a administração oral de captopril para ratos SHR durante duas semanas apenas normalizou os níveis pressóricos, sem induzir hipotensão sistêmica.

## **2.0– Medidas de peso corporal e ventricular e Índice pulmonar**

Corroborando com estudos prévios (Morita et al., 1996; Suylen et al., 1998, Ito et al., 2000; Inoue et al., 2002; Nagaya et al., 2003; Lee et al., 2005; Nihei et al., 2005), os animais do presente estudo tratados somente com MCT apresentaram uma significativa redução do ganho de peso corporal comparado com o grupo CON.

Embora os artigos supracitados não discutam o mecanismo de redução de peso corporal no modelo MCT, acreditamos que um dos fatores responsáveis foi a hipoxemia desenvolvida por estes animais. Estudos de Singh e Selvamurthy (1993) mostraram que ratos submetidos à hipoxia crônica intermitente apresentaram uma diminuição gradual da quantidade total de alimentos consumidos e consequente redução do ganho de peso corporal. O efeito anoréxico da hipóxia já havia sido descrito em 1974 por Koob e Annau, e continua sendo descrito em estudos atuais, como o realizado recentemente por Wing-gaia et al. (2014), que também observou uma significativa perda de peso corporal em indivíduos submetidos a hipóxia crônica por permanência em uma base em Everest, local este de elevada altitude e baixa tensão atmosférica de oxigênio.

De acordo com Yu et al. (1999), a perda de peso em condições de hipóxia crônica pode refletir várias alterações na função cardiovascular, na produção hormonal, no metabolismo energético bem como em outros aspectos da fisiologia celular e sistêmica. Em nosso estudo, os animais do grupo MCT apresentaram

alterações cardiovasculares e respiratórias que culminam com um maior gasto energético e que podem ter contribuído para esta redução do peso corporal, dentre as quais podemos citar o aumento do trabalho respiratório evidenciado pela elevação da FR, o aumento do trabalho cardíaco decorrente do aumento da resistência vascular pulmonar e consequente hipertrofia ventricular direita, dentre outros.

Entretanto, não podemos afirmar se a redução do ganho de peso corporal foi causada principalmente pela redução de ingestão de alimentos ou pelo aumento do gasto energético, uma vez que neste estudo não foi quantificada a ingestão de ração dos animais, sendo necessários estudos adicionais para averiguar esta hipótese.

A redução do ganho de peso corporal observada nos nossos animais pertencentes ao grupo MCT foi significativamente amenizada após o tratamento com captopril, porém sem normalizar em relação ao grupo controle. Acreditamos que esta resposta está associada à reversão da hipoxemia e melhora da hemodinâmica ventricular direita destes animais, e a não normalização deste parâmetro pode se justificar pela grande perda de peso corporal observada durante o período de indução da doença e antes que o tratamento medicamentoso fosse instituído.

Entretanto, contrariando nossos achados, o estudo realizado por Suylen et al. (1998) não observou melhora hemodinâmica e nem aumento do ganho de peso corporal após o tratamento dos animais com HAP induzida por MCT com captopril. Acreditamos que essa diferente resposta possa ser atribuída à dose de captopril utilizada pelos autores, que foi expressivamente inferior à administrada no presente estudo.

No que diz respeito às medidas de peso ventricular, a instalação da hipertrofia de VD, parâmetro imprescindível para confirmação da instalação da HAP,

foi avaliada no presente estudo através do Índice de Fulton, também denominado Índice Pulmonar. Este índice foi descrito por Fulton et al. em 1952 e tem sido utilizado nas últimas décadas por diversos autores (Schultze et al., 1993; Inoue et al., 2002; Nihei et al., 2005; Al Ansari et al., 2007; Gomez-Arroyo et al., 2012). A determinação deste índice é baseada na relação entre o peso do VD e o peso do VE adicionado ao septo interventricular, ambos corrigidos pelo peso corporal.

A hipertrofia cardíaca é um processo adaptativo à sobrecarga de pressão ventricular, e desenvolve-se gradualmente por semanas, podendo conduzir à insuficiência cardíaca. Uma das vantagens do modelo MCT é a facilidade em se obter hipertrofia cardíaca direita após 3 a 4 semanas da aplicação da droga (Gomez-Arroyo et al., 2012) sem alterações no VE, sendo que a insuficiência cardíaca esquerda só ocorre em um estágio tardio da doença.

Conforme esperado, em nosso estudo a análise deste índice evidenciou o desenvolvimento da HAP nos ratos tratados com MCT. Além disso, observamos que o tratamento com captopril, embora não tenha normalizado, atenuou significativamente este índice, sugerindo que esta droga foi eficaz em melhorar a disfunção cardíaca direita decorrente da HAP.

Corroborando com os nossos achados, o estudo de Kanno et al. (2001) também evidenciou uma significativa redução da hipertrofia de VD após o tratamento com inibidor da ECA em ratos com HAP induzida por MCT. Estudos de Chassagne et al. (2000), demonstraram uma reversão da muscularização vascular pulmonar de ratos com HP hipóxica tratados com losartan, enquanto que Morrel et al. (1995) demonstraram a reversão da hipertrofia de VD após tratamento com captopril em ratos com HP hipóxica. Nos estudos anteriores de Qing e Garcia (1992), o tratamento com captopril reverteu a hipertrofia de VD de ratos com fístula aorto-cava.

Os estudos realizados por Molteni et al. (1986) também haviam observado uma reversão da hipertrofia ventricular direita em ratos MCT tratados com uma outra droga inibidora da ECA, denominada CL242817.

Em adição, estudos de Yamazato et al. (2009), observaram que o tratamento de ratos MCT com ECA2, que é um homólogo da ECA capaz de degradar AII em Angiotensina 1-7, reverteu a hipertrofia e a elevação da pressão sistólica de VD reforçando a importância do SRA na fisiopatogenia da HAP neste modelo.

Entretanto, resultados diferentes dos nossos foram observados nos estudos de Cassis et al. (1992) e Kreutz et al. (1996), visto que ambos os trabalhos evidenciaram a ineficácia do losartan na reversão da hipertrofia de VD e da elevação da PA pulmonar em ratos com HAP. Uma possível hipótese que poderia justificar a aparente maior eficácia do captopril, que foi utilizado em nosso estudo, em comparação com o losartan na melhora da hemodinâmica de ratos com HAP, seria a existência do radical “tiol” apenas no captopril, como acima discutido, uma vez que este tem potentes efeitos anti-oxidantes.

Entretanto, estes resultados promissores obtidos com o tratamento da HAP com captopril aparentemente não são reprodutíveis em humanos. O estudo realizado por Leier et al. (1983) em humanos com HP primária, demonstrou apenas uma redução da PA sistêmica dos pacientes após o tratamento com captopril, sem nenhuma melhora dos demais parâmetros hemodinâmicos. Assim como no estudo de Leier, no estudo de Rich et al. (1982), os pacientes com HP idiopática tratados com captopril não apresentaram melhoras hemodinâmicas. Não encontramos estudos que avaliassem a eficácia do captopril em pacientes com HAP induzida por drogas e/ou toxinas, que é o subtipo de HAP em humanos que mais se assemelha ao modelo experimental induzido por MCT.

### 3.0– Avaliação Respiratória e Gasométrica

Para a mensuração dos parâmetros respiratórios, utilizamos a técnica de “pletismografia de corpo inteiro”, previamente descrita por Malan (1973), e posteriormente utilizada por outros estudos experimentais (Bartlett Jr, 1971; Mauad et al., 1992). O princípio deste método consiste de uma câmara hermética onde o animal é colocado e cuja temperatura do ar da câmara difere da temperatura do ar dos pulmões do animal. As variações cíclicas da temperatura e pressão de vapor de água do volume corrente (inspiração/expiração) produzem variações de pressão na câmara, proporcional a esse volume corrente. Estas variações cíclicas na temperatura e pressão de vapor de água ocorrem a cada ciclo respiratório. À medida que a temperatura do ar da câmara se eleva devido à respiração do animal, há um aumento da pressão dentro da câmara. Este método tem a grande vantagem de permitir o registro dos parâmetros ventilatórios com o animal não-anestesiado (Malan, 1973).

Observamos que os parâmetros ventilatórios analisados (VC, FR, V<sub>min</sub> e V<sub>A</sub>) foram modificados apenas nos animais que receberam MCT e desenvolveram HAP. Sabe-se que a MCT causa uma hipertrofia da camada média dos vasos pulmonares com consequente redução do lúmen e aumento da resistência vascular pulmonar (Suylen et al., 1998). Além disso, a infusão desta droga desencadeia uma cascata inflamatória associada a alterações pulmonares intersticiais, dificultando assim a troca gasosa (Schwenke et al., 2009). Desta forma, sabendo-se do desenvolvimento de mudanças estruturais do parênquima pulmonar em associação com alterações vasculares pulmonares em animais com HAP induzida por MCT, podemos sugerir que estes animais tiveram um comprometimento da relação ventilação/perfusão pulmonar e uma menor eficiência das trocas gasosas.

Observamos nos animais do grupo de MCT um padrão de hiperventilação, caracterizado pelo aumento de todas as variáveis estudadas pela pletismografia. Não encontramos estudos que analisassem todas as variáveis respiratórias por nós estudadas em modelos de HAP, entretanto, relatos subjetivos de “taquipnéia” em ratos tratados com MCT foram descritos nos estudos de Nihei et al. (2005), porém sem uma quantificação deste e de outros parâmetros ventilatórios. Outro relato subjetivo de aumento da FR no modelo de HAP induzida por MCT foi documentado anteriormente por Brown et al. (1998), o qual observou uma taquipnéia associada a sinais de “desconforto respiratório”. Estes autores correlacionaram estes achados com uma diminuição da densidade dos adrenoreceptores  $\beta_2$  nos pulmões desses animais. Sabidamente, a estimulação destes receptores causa broncodilatação e aumenta a concentração de adenosina monofosfato em mastócitos e basófilos, reduzindo a liberação de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Barnes, 1999). Assim, a diminuição dos adrenoreceptores- $\beta_2$  nos pulmões nesse modelo poderia trazer implicações respiratórias importantes, uma vez que a broncoconstrição poderia diminuir o fluxo aéreo para os alvéolos promovendo um quadro de hipoxemia e/ou hipercapnia, que seria compensada reflexamente com uma elevação da FR, tal como observada em nosso estudo, além de um maior esforço respiratório.

O esforço respiratório é um parâmetro subjetivo e não mensurável em animais, o que justifica o fato de não termos incluído esta informação em nossos resultados. Entretanto, através da observação dos animais tratados com MCT, podemos sugerir que estes animais tiveram uma piora do padrão respiratório, uma vez que os mesmos apresentavam sinais visíveis de desconforto respiratório.

O impacto das alterações vasculares e parenquimatosas presentes no modelo MCT sobre o sistema respiratório vem sendo demonstrado por alguns estudos prévios, porém as implicações cardiovasculares das modificações do padrão respiratório permanecem por serem elucidados. Estudos de Dumitrascu et al. (2008), mostraram que a  $PaO_2$  medida em amostras de sangue arterial de ratos tratados com MCT foi significativamente menor comparado com animais controle. Resultados semelhantes foram descritos por Schermuly et al. (2004), que não apenas observaram uma redução da  $PaO_2$  nos ratos tratados com MCT, mas também uma redução da relação entre este parâmetro e a fração inspirada de oxigênio, relação esta denominada “índice de oxigenação”.

Em adição, estudos de Sugita et al. (1983) mostraram a ocorrência de migração de granulócitos para o espaço alveolar associado à extravasamento microvascular pulmonar, mecanismo este que pode justificar o edema pulmonar observado em animais com este modelo de HAP (Reindel et al., 1990; Shenoy et al., 2010). Uma vez que o edema pulmonar sabidamente aumenta a barreira alvéolo-capilar e prejudica a troca gasosa, ele pode ter contribuído para as alterações respiratórias observadas em nosso estudo.

Para complementar a avaliação respiratória e verificar o equilíbrio ácido-básico, realizamos também a análise gasométrica, através da coleta de sangue arterial. Através da gasometria, pudemos constatar que os animais que receberam MCT e desenvolveram HAP apresentaram uma menor eficácia ventilatória, uma vez que, embora estes grupos tenham apresentado um aumento dos parâmetros ventilatórios (FR, VC,  $V_{min}$ ,  $V_A$ ), este foi acompanhado de uma piora da troca gasosa, o que se evidenciou pela análise gasométrica, que apresentou um padrão de hipoxemia (redução da  $P_aO_2$ ) e redução de  $S_aO_2$ , associada à retenção de  $CO_2$ ,

ocasionando uma maior acidose (redução do pH) e aumento de bicarbonato, provavelmente como um mecanismo compensatório.

Uma vez que, apesar do aumento da ventilação, estes animais tiveram uma piora da gasometria, acreditamos que o desenvolvimento de um padrão ventilatório mais “rápido e profundo” ocorreu como uma tentativa compensatória à hipóxia e hipercapnia. Sabe-se que as modificações dos níveis tensionais de  $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$  do sangue arterial podem ser detectadas através de quimiorreceptores periféricos e centrais, os quais, uma vez ativados, geram mecanismos compensatórios. O aumento de  $\text{CO}_2$  gera uma estimulação dos quimiorreceptores centrais, enquanto a redução da  $\text{PaO}_2$  ativa os quimiorreceptores periféricos, e ambas as alterações gasométricas (aumento de  $\text{pCO}_2$  e redução de  $\text{pO}_2$ ), tem como resposta uma hiperventilação, ocasionada por aumento de frequência e/ou profundidade da respiração (Kara et al., 2003). Isto foi confirmado em nossos experimentos, uma vez que os animais do grupo MCT evidenciaram uma hiperatividade do quimiorreflexo.

Após o tratamento dos animais com HAP através da administração de captopril (grupo MCT-CPT), todos os parâmetros ventilatórios e gasométricos normalizaram em comparação com o grupo controle. Acreditamos que a normalização da ventilação pulmonar e trocas gasosas destes animais seja resultante da inibição do SRA associado com os efeitos anti-oxidantes desta droga, que possibilitou uma redução da hipertrofia da musculatura lisa das arteríolas pulmonares com consequentes redução da resistência vascular pulmonar e da pós-carga ventricular direita, normalizando a hipertrofia ventricular e melhorando a perfusão pulmonar. Ou seja, uma vez que esta droga conseguiu reverter as principais consequências causadas pela HAP no sistema cardiopulmonar, ocasionando a melhora da perfusão pulmonar em associação com a melhora dos



parâmetros morfométricos e restauração do lúmen, isto justificou a normalização da atividade quimiorreflexa e da troca gasosa observada nestes animais.

Estudos de Adamy et al. (2002), mostraram que a presença de hipóxia crônica em animais com HAP pode agravar ainda mais o curso da doença, uma vez que a redução de oxigenação arterial tem como uma das consequências o aumento da expressão dos receptores de AII, o que vem a reforçar a importância da utilização de inibidores da ECA e consequente redução dos níveis de AII.

#### **4.0 – Avaliação Autonômica**

A disfunção autonômica se refere àquela condição na qual a função autonômica se altera de forma a afetar adversamente a saúde. Diferentes métodos vêm sendo utilizados para avaliação da atividade do sistema nervoso autônomo (SNA), especialmente nas doenças cardiovasculares, visando evidenciar a contribuição desse sistema nas respostas alteradas associadas à doença cardiovascular.

Uma forma de avaliação da atividade do SNA é através da mensuração dos níveis de catecolaminas circulantes. Em pacientes com HAP, existem descrições tanto de níveis elevados de catecolaminas (Haneda et al., 1983; Nagaya et al., 2000); como de manutenção destes dentro dos limites normais (Richards et al., 1990; Nootens et al., 1995). Estas discrepâncias podem estar relacionadas ao fato de que as catecolaminas circulantes são marcadores imperfeitos da atividade do sistema nervoso simpático, sendo afetados por uma variedade de processos, incluindo mudanças na síntese, metabolismo e facilitação da liberação pelas terminações nervosas periféricas.

No presente estudo, a avaliação dos componentes autonômicos simpático e parassimpático cardíacos foi feita através da análise das variações de FC após os bloqueios farmacológicos com atenolol (antagonista dos adrenoreceptores  $\beta_1$ ) e metil-atropina (antagonista muscarínico não seletivo).

Os animais submetidos à HAP com MCT apresentaram um significativo aumento do componente simpático com concomitante redução do componente parassimpático. Corroborando com os nossos resultados, os estudos experimentais de Ishikawa et al. (2009) também observaram, através de bloqueios farmacológicos em ratos *wistar* tratados com MCT, que ocorre uma significativa hiperatividade simpática nestes animais. Em adição, Nihei et al. (2005) observaram uma atenuação do componente parassimpático em ratos com disfunção cardiovascular induzida por MCT.

Estudos de Sanyal e Ono (2002) avaliaram a atividade do SNA em animais tratados com MCT através de bloqueios autonômicos induzidos pela administração de atropina e propanolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico não-seletivo). Após a administração de atropina, a magnitude da variabilidade da FC foi menor no grupo MCT em relação ao controle, indicando uma diminuição na função do controle parassimpático, dados estes em acordo com os nossos estudos. Entretanto, após administração do propanolol, os autores observaram resultados contrários aos nossos, ou seja, uma variabilidade da FC de magnitude similar entre os grupos, indicando a preservação da atividade simpática nos animais com HAP.

Algumas hipóteses para explicar a hiperatividade simpática observada nos animais submetidos à HAP seriam: a) estimulação dos quimiorreceptores; b) atenuação do ganho barorreflexo, c) modulação do sistema respiratório sobre o sistema cardiovascular, d) aumento dos níveis de All.

No presente estudo, acreditamos que tanto a hipoxemia como a hipercapnia e consequente redução do pH observado na análise gasométrica dos animais tratados com MCT poderiam estar promovendo a estimulação dos quimiorreceptores (Sapru e Krieger, 1977), justificando a hiperatividade quimiorreflexa observada nestes animais. A alteração da atividade quimiorreflexa decorrente principalmente da hipóxia, produz mudanças da atividade simpática e vagal para o coração e evoca ajustes centrais para ventilação e função cardiovascular como uma tentativa de manter a perfusão adequada dos órgãos vitais (Vasquez et al., 1997).

As respostas cardiovasculares desencadeadas pela estimulação dos quimiorreceptores são simpato-excitação (aumento da PA) e parassimpato-excitação (bradicardia), além de respostas respiratórias (hiperpnéia e taquipnéia) (Haibara et al., 1995), respostas estas observadas nos animais tratados somente com MCT em nosso estudo.

Considerando-se ainda a participação dos reflexos cardiovasculares na modulação das respostas autonômicas, a participação do barorreflexo não pode ser descartada. É amplamente conhecido que este reflexo participa da regulação da PA momento-a-momento, promovendo simpato-inibição, assim como parassimpato-excitação. Estudos da década de setenta, já haviam descrito a ocorrência de disfunção barorreflexa em humanos em situações de hipertensão arterial sistêmica (Takeshita et al., 1975; Gribbin et al., 1975) e insuficiência cardíaca (Eckberg et al., 1971), entretanto, pouco se sabe atualmente sobre o comportamento deste reflexo na HAP. Mostarda et al. (2011) observaram que ratos com disfunção diastólica apresentam uma redução da atividade barorreflexa associada ao aumento da atividade simpática. Em adição, Patakas et al. (1982) concluíram em seus estudos que a elevação da pressão média da artéria pulmonar em pacientes com doença

pulmonar obstrutiva crônica é a principal causa para a atenuação do barorreflexo. Com isto, acreditamos que os animais MCT de nosso estudo apresentaram a redução da atividade barorreflexa em consequência das alterações vasculares pulmonares e que esta contribuiu para o prejuízo da modulação autonômica observado, resultando em simpato-excitação, bem como inibição do componente parassimpático.

Outra possibilidade a ser considerada é a ocorrência de interação entre os sistemas respiratório e cardiovascular. O controle do ritmo cardíaco e respiratório é regulado sinergicamente com o intuito de promover uma adequada ventilação-perfusão ao nível pulmonar, assegurando uma troca gasosa eficiente (Spyer e Gourine, 2009). Anatomicamente, os circuitos neuronais vagais pré-ganglionares cardíacos e os circuitos pré-sinápticos estão localizados nas regiões ventrolaterais do bulbo, próximos aos circuitos neuronais respiratórios. Existe uma integração cardiorrespiratória, que pode ser demonstrada pela flutuação da FC, conhecida como “arritmia sinusal respiratória”, na qual a frequência de disparo dos neurônios cardio-vagais aumenta durante a expiração e reduz durante a inspiração, resultando em bradicardia e taquicardia, respectivamente. Isto pode ser explicado pelo fato dos neurônios vagais pré-ganglionares, localizados no núcleo ambíguo (NA), receberem potentes descargas inibitórias durante a inspiração e descargas excitatórias durante o período pós-inspiratório (Spyer e Gourine, 2009). A associação entre a atividade inspiratória e a inibição da bradicardia também é observada quando certas áreas cerebrais são estimuladas. Ou seja, certas áreas que promovem inibição da bradicardia, também promovem elevação da atividade respiratória, enquanto que a estimulação de outras áreas promove bradicardia e apnéia. Assim, no que se refere

ao presente estudo, o aumento da FR poderia estar mediando este efeito vagolítico mediado pelos circuitos respiratórios centrais.

A influência da distensão pulmonar na atividade autonômica também deve ser considerada. De acordo com Lopes e Palmer (1976), quando ocorre a distensão pulmonar, a descarga pulmonar aferente impede o desenvolvimento de bradicardia pela estimulação do nervo do seio carotídeo. Segundo Abboud e Thames (1979), na musculatura lisa das vias aéreas existem receptores que quando ativados, enviam sinais ao SNC, através de fibras vagais do tipo A, resultando em taquicardia por inibição da atividade eferente vagal. Os mecanismos envolvidos nesta inibição reflexa dos neurônios cardio-vagais pelo estiramento pulmonar ainda não estão completamente esclarecidos, porém não podem ser descartados no que se refere a contribuição para a disautonomia observada, uma vez que os animais com HAP apresentaram um significativo aumento do  $V_C$ .

Por fim, acreditamos que ocorreu uma possível ativação do SRA dos animais tratados com MCT em nosso estudo a qual contribui com a disautonomia observada. Man et al. (2012) descreveram que as alterações vasculares pulmonares e de ventrículo direito observadas na HAP causam uma redução do débito cardíaco associada com consequente ativação de sistemas neuro-humorais, tais como o SRA, que tem como uma das consequências a elevação da atividade nervosa simpática.

Acreditamos ainda, que a elevação dos níveis de All e a consequente hiperatividade simpática contribuíram para a progressão das disfunções dos animais com HAP induzida por MCT, uma vez que os estudos de Ishikawa et al. (2009) demonstraram que o bloqueio da atividade do SNS através de bloqueador  $\alpha/\beta$  adrenérgico em ratos MCT é capaz de prevenir a hipertrofia de VD e normalizar a pressão sistólica desta câmara.

Esta hipótese vem a ser reforçada através da análise do comportamento do sistema nervoso autonômico dos animais com HAP tratados com captopril no presente estudo, uma vez que estes animais apresentaram não apenas a normalização das alterações hemodinâmicas, mas também a normalização dos componentes simpático e parassimpático.

## **5.0 – Avaliação Reflexa**

### **5.1 – Barorreflexo**

O barorreflexo é um importante mecanismo neural regulador da PA, atuando batimento-a-batimento no intuito de impedir alterações bruscas. No presente estudo, observamos uma significativa diminuição na sensibilidade (ganho) do barorreflexo em animais tratados com MCT. Vários estudos na literatura têm demonstrado um prejuízo do funcionamento barorreflexo em animais portadores de hipertrofia cardíaca esquerda (Creager e Creager, 1994; Mortara et al., 1997; Vasquez et al., 1997), entretanto, pouca ênfase tem sido dada a função barorreflexa em animais com hipertrofia cardíaca direita, sendo que os poucos dados disponíveis são de certa forma contraditórios.

Estudos recentes demonstraram que ocorre um comprometimento da atividade barorreflexa na disfunção diastólica cardíaca (Mostarda et al, 2011) e em hipóxia intermitente (Lai et al, 2006), em ratos anestesiados submetidos à hipóxia hipobárica intermitente crônica. Wensel et al. (2009), em um estudo com 48 pacientes com diagnóstico clínico de HAP, observaram a redução da sensibilidade barorreflexa em associação com o aumento da atividade nervosa simpática, o que corrobora com os nossos dados, embora nosso estudo tenha sido realizado com animais.

Considerando que, Patakas et al. (1982) demonstraram que a elevação da PA pulmonar em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica foi o principal fator responsável pela diminuição da resposta barorreflexa, acreditamos que a elevação desta pressão nos animais do grupo MCT do nosso estudo provavelmente contribuiu para a atenuação deste reflexo que foi observada. Em adição, acreditamos que a hipóxia e o consequente aumento da atividade quimiorreflexa observada neste grupo de animais pode ter contribuído para a disfunção barorreflexa.

Esta inter-relação entre os reflexos baseia-se na existência de fibras aferentes dos quimiorreceptores periféricos e dos barorreceptores arteriais terminando no núcleo do trato solitário (NTS), que constitui uma importante área bulbar integradora das informações sensoriais aferentes dos reflexos cardiovasculares. De acordo com Henry et al. (1998), tanto as aferências quimiorreceptoras poderiam inibir a função barorreflexa, ao nível central, como as aferências barorreceptoras poderiam inibir a função quimiorreflexa (Henry et al., 1998).

Em adição, acreditamos que a disfunção do SRA nos animais MCT relatada na literatura pode ter contribuído para a disfunção barorreflexa observada, uma vez que, segundo Kar et al. (2011), na insuficiência cardíaca crônica, a função do barorreflexo arterial é prejudicada, pelo menos em parte, pela ativação do SRA central. Isto foi comprovado por esses autores, através da administração central de Angiotensina (1-7) para coelhos com insuficiência cardíaca e a observação da recuperação da sensibilidade barorreflexa nestes animais. Foi também demonstrado que a regulação positiva de ACE2 no pulmão pode melhorar a patologia associada com a HP.

Nossos resultados sugerem também a influência da hiperatividade do SRA na disfunção barorreflexa, uma vez que o tratamento destes animais com captopril (grupo MCT-CPT) restaurou todos os parâmetros utilizados para o estudo do barorreflexo. Entretanto, não existem na literatura estudos que avaliem a influência do captopril na atividade barorreflexa de animais tratados com MCT, sendo necessários estudos posteriores para evidenciar se a restauração deste reflexo em nosso estudo foi consequência da inibição do SRA ou da reversão das consequências histológicas e hemodinâmicas, ou até mesmo, da associação destes dois mecanismos.

## 5.2 – Quimiorreflexo

Os quimiorreceptores arteriais respondem a aumentos ou quedas de  $\text{PaO}_2$ ,  $\text{PaCO}_2$  e/ou pH, desencadeando respostas homeostáticas do sistema cárdio-respiratório para corrigir essas variações. Quedas na  $\text{PaO}_2$ , aumentos na  $\text{PaCO}_2$  e queda no pH, promovem respostas reflexas caracterizadas por aumento da resistência periférica e alterações na FC (Marshall et al., 2000).

Alguns estudos têm relatado que o quimiorreflexo induzido pela hipóxia está exacerbado em animais SHR (*spontaneous hypertensive rats*) e na hipertensão humana (Trzebsky, 1992). Entretanto, não encontramos estudos que avaliassem as respostas quimiorreflexas em modelo de animais com HP induzida por MCT.

Em nosso estudo, os animais do grupo MCT apresentaram uma exacerbação da atividade quimiorreflexa, o que acreditamos que tenha sido consequência não apenas das alterações gasométricas apresentadas por estes animais, mas também da ativação do SRA.

O estudo realizado por Leung et al. (2003), sugere que a atividade quimiorreflexa pode estar alterada na HAP, uma vez que os autores descreveram



que a hipóxia crônica, que é um achado típico da doença em estágio avançado, causa alterações dos quimiorreceptores carotídeos associadas ao remodelamento estrutural e hipertrofia e hiperplasia das células glômicas, que são as células quimiossensíveis (sensoriais) do corpo carotídeo. Os autores sugerem também que a AII modula a descarga aferente do seio nervoso no corpo carotídeo provavelmente mediado por receptores AT1 do corpo carotídeo, o que eleva os níveis de cálcio dentro das células glômicas e a atividade eferente carotídea, aumentando a atividade quimiorreflexa.

A participação dos receptores AT1 na atividade nervosa do seio carotídeo foi descrita previamente por Allen (1998), que em seus estudos observou que ocorre a ativação quimiorreflexa em resposta ao aumento dos níveis de AII, e que este aumento de atividade pode ser suprimido através da administração de Losartan, que é uma droga inibidora de receptores AT1.

Em adição, em 2000, Leung et al. já haviam demonstrado em estudos experimentais com ratos que a hipóxia crônica aumenta a atividade quimiorreflexa mediada pelos receptores AT<sub>1</sub> do corpo carotídeo (Leung et al, 2000).

Os animais com HAP do presente estudo tratados com captopril apresentaram uma normalização da atividade quimiorreflexa, o que acreditamos que foi causado pela restauração da troca gasosa bem como pela normalização da atividade autonômica e dos níveis de AII. Entretanto, uma vez que não mensuramos os níveis plasmáticos de AII e da ECA, não podemos fazer tal afirmação.

Curiosamente, os animais *Wistar* tratados somente com captopril apresentaram uma atenuação do quimiorreflexo em comparação com o grupo controle. Acreditamos que uma possível explicação para tal resposta seria que, uma vez que esta droga causa redução dos níveis de AII, isto poderia reduzir a atividade

das células quimiossensíveis do corpo carotídeo. Porém, também não encontramos trabalhos que avaliassem os efeitos do captopril na atividade quimiorreflexa de animais *Wistar* saudáveis.

### 5.3 – Reflexo Bezold-Jarisch (RBJ)

O RBJ é um reflexo vagal, que foi inicialmente observado experimentalmente. A existência de receptores cardíacos afetando o sistema cardiovascular foi sugerida há mais de 100 anos por Von Bezold e Hirt. Eles observaram que ocorre uma abrupta e transitória hipotensão e bradicardia após injeções intravenosas de veratridina em cães, efeito esse que poderia ser abolido pela secção dos nervos vagos. Somente 70 anos depois, Jarisch e Richter demonstraram que os efeitos cardiovasculares dependiam de receptores ventriculares cardíacos (Longhurst, 1984).

Sabe-se que a inervação aferente do coração é composta por fibras mielinizadas e não-mielinizadas, as quais caminham junto aos nervos vago e simpático (Longhurst, 1984). As fibras aferentes vagais não-mielinizadas foram identificadas nos átrios por Coleridge et al. (1973), as quais podem ser estimuladas tanto química, quanto mecanicamente.

O presente estudo avaliou a resposta do RBJ através de excitação química por meio da fenilbiguanida, que é uma droga capaz de estimular somente fibras não-mielinizadas (Kaufman et al., 1980). Em ratos, a estimulação química com fenilbiguanida promove respostas hipotensoras e bradicárdicas através da estimulação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> (denominado reflexo Bezold-Jarisch), os quais estariam localizados principalmente no átrio e VE (Chianca e Machado, 1994; Vasquez et al., 1997).

Atualmente, o papel funcional do RBJ ainda não está totalmente elucidado, sendo que a investigação da atuação deste reflexo, especialmente em doenças cardiovasculares, tem despertado o interesse de alguns pesquisadores.

Em seres humanos, foi demonstrado que este reflexo está exacerbado em pacientes portadores de hipertensão arterial limítrofe (Zanchetti e Mancia, 1991; Mark e Kerber, 1982). Em animais, Meyrelles et al. (1997) observaram que, no infarto do miocárdio realizado em ratos, ocorre uma atenuação significativa do RBJ, que os autores acreditam que seja decorrente de alterações funcionais dos receptores quimiossensíveis das aferências cardíacas vagais não-mielinizadas. A atenuação do RBJ também foi demonstrada em estudos com modelos de hipertrofia miocárdica esquerda (Ferrari et al., 1984; Zanchetti et al., 1991). Meyrelles et al. (1994) demonstraram que ocorre prejuízo do RBJ apenas em ratos hipertensos que desenvolvem hipertrofia ventricular esquerda, sendo que os ratos hipertensos que não apresentaram alterações da massa ventricular tinham este reflexo preservado, o que vem a ressaltar a importância da localização destes receptores.

Entretanto, não há estudos na literatura que tenham avaliado este reflexo em modelos de hipertrofia ventricular direita, tal como é observado em ratos tratados com MCT, o que talvez se deva a falta de evidências científicas de receptores localizados na câmara cardíaca direita. Keeble e Tymchak (2008), em um estudo de caso demonstraram uma profunda bradicardia e queda da PA sistólica após oclusão aguda completa da artéria coronária direita, resposta esta provavelmente resultante da ativação do RBJ. Alguns anos depois, Raut e Maheshwari (2013), demonstraram em outro estudo de caso que a oclusão súbita da artéria coronária direita, pode causar síncope induzida pela estimulação do RBJ. Em ambos os trabalhos, os autores acreditam que não apenas a oclusão coronariana, mas principalmente a

reperfusão foram responsáveis pela ativação dos receptores químicos e mecânicos da região ínfero-posterior do miocárdio cardíaco, que é perfundida pela artéria coronária direita em aproximadamente 90% dos indivíduos.

Considerando que os animais tratados com MCT em nosso estudo desenvolveram significativa hipertrofia ventricular direita, isto poderia reduzir a perfusão coronariana ventricular direita, mas, diferentemente dos trabalhos supra citados, os animais que avaliamos provavelmente apresentaram privação de fluxo crônica, decorrente da hipertrofia ventricular direita e esta não foi acompanhada de reperfusão súbita.

Em adição, Westendorp et al. (1997) descreveram casos de síncope em humanos saudáveis submetidos a hipóxia aguda em uma câmara de baixa pressão simuladora de altitude, sugerindo que os episódios ocorreram devido à ativação do RBJ. Não encontramos estudos que avaliassem se a hipóxia crônica, a qual foi observada nos animais MCT do presente estudo, influencia a resposta do RBJ. Outra possível causa de ativação deste reflexo refere-se à hipovolemia. Segundo Kinsella e Tuckey (2001), isto ocorre porque nesta situação há estimulação miocárdica associada com baixas pressões de enchimento, o que pode estimular os nervos sensitivos por causar uma deformação mecânica. Considerando que os animais do grupo MCT deste estudo apresentaram alterações gasométricas e morfométricas que sabidamente estão associadas ao aumento da resistência vascular pulmonar, possivelmente isto levou a uma redução do fluxo pulmonar e consequentemente do enchimento ventricular esquerdo, o que poderia causar uma deformação mecânica dos receptores ventriculares esquerdos e consequente ativação do RBJ.

No nosso estudo, embora a análise das respostas hipotensoras e bradicárdicas realizada em cada diferente dose de FBG não tenha evidenciado um padrão de resposta muito claro nos diferentes grupos de estudo, a análise do ganho médio obtido considerando as cinco diferentes doses de FBG empregadas, evidenciou uma atenuação significativa do RBJ apenas no grupo MCT em comparação com os demais grupos. A escassez de estudo nos impede de tirar conclusões sobre este achado, mas nos permite hipotetizar que fatores como a hipoxemia e a hipertrofia ventricular direita observados no grupo MCT podem ter participado desta atenuação. Em adição, considerando que em animais também é elevada a dominância direita, ou seja, na maior parte dos animais a irrigação do septo interventricular posterior provém da coronária direita, acreditamos que a hipertrofia e a disfunção observados nesta câmara pode ter reduzido a perfusão desta coronária e, conseqüentemente, uma vez que uma pequena porção da massa ventricular esquerda tenha apresentado uma irrigação comprometida, isto pode ter reduzido a função de alguns receptores do RBJ e alterado a resposta reflexa.

Entretanto, estas são apenas hipóteses, uma vez que a escassez de estudos que avaliem a atividade do RBJ no modelo MCT impossibilitou um maior esclarecimento acerca da influência da HAP experimental neste reflexo.

O tratamento com captopril normalizou a atividade do RBJ, o que provavelmente foi consequência da normalização dos parâmetros respiratórios e cardiovasculares. Em adição, MacFayden et al. (1991) observaram uma queda na PA de pacientes após receberem a primeira dose de captopril e relataram que um possível mecanismo para justificar esta queda seria a ativação do RBJ mediada pela ativação vagal. Os animais do nosso estudo que fizeram tratamento somente com

captopril não apresentaram alterações significantes deste reflexo e não encontramos dados literários que esclarecessem se este resultado era esperado.

## **6.0 – Avaliação Histológica**

Em relação à análise histológica, considerando que a hipertrofia da camada média das artérias e arteríolas pulmonares é um fator determinante para o desenvolvimento da HAP no modelo MCT, no presente estudo mensuramos a espessura da camada média destes vasos.

Nos animais tratados com MCT, observamos um significativo aumento da espessura da túnica média acompanhada da redução do lúmen em comparação com os animais do grupo tratado com salina, confirmando a existência de hipertrofia desta camada média arterial e arteriolar.

Através da análise literária, pudemos observar que a grande maioria dos estudos experimentais que investigam a HAP e a eficácia de tratamentos terapêuticos nesta doença, não utilizam a análise histológica como método complementar para avaliar a eficácia dos tratamentos. Entretanto, alguns autores que utilizaram o mesmo modelo de HAP que o nosso, observaram dados semelhantes, ou seja, redução do lúmen dos vasos pulmonares associado ao aumento da musculatura vascular e aumento da relação da parede/lúmen (Ito et al. 2000; Nagaya et al. 2003; Lee et al. 2005; Ludke et al., 2010).

A hipertrofia da musculatura lisa das arteríolas pulmonares promove o aumento da resistência vascular pulmonar e da pós-carga ventricular direita, trazendo como consequência a hipertrofia e aumento das pressões desta câmara cardíaca (Suylen et al, 1998), fato este que foi constatado em nosso estudo através da avaliação hemodinâmica.

Embora atualmente o modelo de MCT seja amplamente utilizado para o estudo da HAP, os mecanismos que levam ao espessamento medial arteriolar pulmonar dos animais ainda não estão totalmente elucidados. Ito et al. (2000) concluiu através de seus estudos que os danos endoteliais causados pela MCT causam uma alteração no potencial da membrana das células musculares da vasculatura pulmonar favorecendo a despolarização das mesmas e a ocorrência de vasoconstrição, o que contribui para a manutenção da HP.

A hiperatividade simpática observada nos animais com HAP neste estudo, assim como o aumento da expressão pulmonar dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Salvi, 1999) poderiam estar contribuindo para o aumento da resistência vascular pulmonar, aumento da pós-carga do VD e sua consequente hipertrofia ventricular direita. O estudo do papel dos receptores adrenérgicos na modulação do tônus das arteríolas pulmonares tem despertado o interesse de vários investigadores. Os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos presentes na vasculatura pulmonar desempenham uma importante função na regulação do tônus vascular pulmonar e contribuem para o desenvolvimento estrutural desta vasculatura através da regulação intranuclear e da síntese proteica (Salvi, 1999). Estudos de Leung et al. (2000) mostraram que a exacerbação do SRA, tal como ocorre nos animais com hipertensão arterial sistêmica, promove uma facilitação da neurotransmissão adrenérgica pré-sináptica. Por outro lado, o estímulo dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos inibe este processo e promove vasodilatação pulmonar (Porcelli et al., 1977). Na circulação pulmonar normal, há uma predominância da atividade  $\beta$ -adrenérgica, favorecendo a vasodilatação e inibindo os fatores de crescimento. Entretanto, nos períodos de hipóxia crônica, como observado na HAP através da MCT, há uma maior expressão dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos e uma diminuição dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos,

predominando os efeitos vasoconstrictores. Estes efeitos poderiam ainda ser potencializados pela hiperatividade simpática observada nestes animais, o que aumentaria ainda mais o tônus da vasculatura pulmonar. Esta constitui a hipótese  $\alpha_1$ -adrenérgica da HAP (Salvi, 1999).

Assim como observamos na análise hemodinâmica, o tratamento dos animais com HAP através da administração de captopril na água de beber normalizou as medidas de espessura e lúmen vascular pulmonar em comparação com os animais do grupo controle.

Resultados semelhantes foram obtidos por Molthen et al. (2010). Neste estudo, os autores trataram dois grupos de animais com HAP induzida por MCT com captopril ou com N-acetylcysteina, que é um potente anti-oxidante. Como resultado, os autores observaram uma melhora dos parâmetros morfométricos e da resistência vascular pulmonar após o tratamento com captopril, o que corrobora com nossos achados. Um dado interessante observado por estes autores, é que o tratamento com N-acetylcysteina não evidenciou nenhuma melhora significativa, o que os levou a concluir que o efeito anti-oxidante do captopril não é o principal responsável pela melhora dos animais com HAP.

Acreditamos que, uma vez que os animais do grupo MCT apresentaram normalização da troca gasosa, da atividade autonômica e da hemodinâmica após o tratamento com captopril, os fatores indutores da hipertrofia vascular pulmonar e consequente redução do lúmen deixaram de atuar, possibilitando uma reversão gradual das alterações morfológicas da vasculatura pulmonar.

Em contrapartida, resultados diferentes aos nossos foram obtidos no estudo realizado por Suylen et al. (1998), os quais não observaram regressão no quadro de HAP induzida pela MCT através das análises histológicas dos animais submetidos



ao tratamento crônico com captopril. Acreditamos que algumas diferenças metodológicas possam justificar as diferentes respostas obtidas, uma vez que a administração da droga no estudo supracitado era através de uma bomba de infusão implantada na região subcutânea dos animais, e a dose administrada era de 0,5 mg/Kg/h, o que corresponde a uma infusão de 12 mg/kg/dia. Em nosso estudo, a dose de captopril administrada foi de 100 mg/kg/dia, o que nos permite supor que, embora a administração contínua tenha como ponto positivo possibilitar a manutenção de níveis plasmáticos da droga, a dose total diária que os animais do nosso estudo receberam foi muito superior, podendo assim justificar a expressiva melhora destes.

Não encontramos estudos que avaliassem o efeito do tratamento com captopril através de doses semelhantes à utilizada neste experimento nas variáveis histológicas de animais com HAP induzida por MCT.

## **CONCLUSÃO**

## CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que o tratamento por 3 semanas com MCT promove um quadro de HAP em ratos *Wistar*, promovendo significativas alterações respiratórias, gasométricas, autonômicas, morfométricas, cardiovasculares hemodinâmicas e reflexas. O tratamento com captopril foi eficaz para melhorar todos os parâmetros estudados após a instalação da HAP.

Cabe ressaltar que o tratamento com captopril normalizou a atividade de todos os reflexos cardiovasculares que estavam alterados nos animais tratados com MCT. Além disso, atenuou também a atividade quimiorreflexa dos animais sem HAP, sugerindo uma importante participação do SRA na atividade quimiorreflexa não apenas na HAP, como também na sua ausência.

Estes resultados sugerem que a inibição do sistema renina angiotensina pode vir a ser uma importante opção para o tratamento da HAP. Além disso, sugerem que alterações vasculares pulmonares observadas no modelo da MCT podem ser mediadas por compostos do sistema renina angiotensina. Estudos adicionais são necessários para avaliarmos o potencial terapêutico de drogas que inibam o SRA na hipertensão arterial em humanos.

## REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

ABBOUD FM, THAMES MD. Interaction of cardiovascular reflexes in circulatory control. *In: The Handbook of Physiology – The Cardiovascular System III*, v.19: p. 675-753, 1979.

ADAMY C, OLIVIERO O, EDDAHIBI S, RAPPAPORT L. Cardiac modulations on ANG II receptor expression in rats with hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 283: p. 733-740, 2002.

AL-ANSARI E, DU H, YU L, OCHOA D, HARI G, QUINN D, HALES C. Low-molecular-weight heparina inhibits hypoxic pulmonary remodeling in guinea pigs. *Chest*, v. 132: p. 1898-1905, 2007.

ALLEN AM. Angiotensin AT<sub>1</sub> receptor-mediated excitation of rat carotid body chemoreceptor afferent activity. *J Physiol*, v. 510: p. 773-781, 1998.

ARCHER SL, MICHELAKIS ED. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, v. 361: p. 1864-71, 2009.

AVIADO DM, AVIADO DG. The B-J reflex - A historical perspective of cardiopulmonar reflexes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 940: p. 48-58, 2001.

BADER M. Tissue rennin-angiotensin-aldosterone systems: targes for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 50: p. 439-65, 2010.

BATYRALIEV TA, AYKIMBAEV KS, KUDEYBERDIEVA GZ, AKGUL FI, SODANBEKOVA GK. The effects of captopril on pulmonary and systemic arterial pressures in high-altitude pulmonary hypertension. *MJIRI*, v. 10(3): p. 179-181, 1996.

BARMAN SA, ZHU S, WHITE RE. RhoA/Rho-kinase signaling: a therapeutic target in pulmonary hypertension. *Vasc Health Risk Manag*, v. 5: 663-671, 2009.

BARNES PJ. Effect of beta-agonists on inflammatory cells. *J Allergy Clin Immunol*, v. 104: p. 10-17, 1999.

BARST RJ, DUNBAR I, DINGEMANSE J, WIDLITZ A, et al. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of bosentan in pediatric patients with pulmonary arterial hypertension. *Clin Pharmacol Ther*, v. 73: p. 372, 2003.

BARTLETT D JR. Origin and regulation of spontaneous deep breaths. *Resp Physiol*; v. 12: 230-238, 1971.

BENZA RL, MILLER DP, BARST RJ, BADESCH BD et al. An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the reveal registry. *Chest*, v. 142(2): 448-456, 2012.

BISCOE TJ, DUCHEN MR. Monitoring PO<sub>2</sub> by the carotid chemoreceptor. *News Physiol Sci*. v. 5: 229-237, 1990.

BOGAARD H, ABE K, NOORDEGRAF AV, VOELKEL NF. The right ventricle under pressure. *Chest*, v. 135: p. 794-804, 2009.

BOLTERMAN RJ, MANRIQUEZ MC, RUIZ MCO, JUNCOS LA, ROMERO JC. Effects of captopril on the renin angiotensin system, oxidative stress, and endothelin in normal and hypertensive rats. *Hypertension*, v. 46 (2): p. 943-947, 2005.

BONNER G, PREIS S, SCHUNK U, WAGMANN M, CHROSCHE R, TOUSSAINT C. Effect of bradykinin on arteries and veins in systemic and pulmonary circulation. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 20(9): p.21-27, 1992.

BROWN AM. Receptors under pressure. *Circ Res*, v. 46: p. 1-10, 1980.

BROWN L, JASON M, ANDREW D, CONRAD S. Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 31(1): p. 108-115, 1998.

CAMPOCCIA JF, ALMADHOOB AR, BECK J, SLUTSKY AS, et al. Neurally adjusted ventilatory assist and pressure support ventilation in small species and the impact of instrumental dead space. *Neonatology* 97, 279–85. (2010).

CASSIS LA, RIPPETOE PE, SOLTIS EE, PAINTER DJ, FITZ R, GILLESPIE MN. Angiotensin II and monocrotaline-induced pulmonary hypertension: effect of losartan (DuP 753), a nonpeptide angiotensin type 1 receptor antagonist. *JPharmacol Exp Ther*, v. 262(3):1168-1172, 1992.

CHASSAGNE C, EDDAHIBI S, ADAMY C, RIDEAU D et al. Modulation of angiotensin II receptor expression during development and regression of hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 22: 323-332, 2000.

CHEN EP, CRAIG DM, BITTNER HB, DAVIS RD, TRIGT PV. Pharmacological strategies for improving diastolic dysfunction in the setting of chronic pulmonary hypertension. *Circulation*, v. 97: p. 1606-1512, 1998.

CHIANCA DJ, MACHADO BH. The sensitivity of the Bezold-Jarisch reflex is increased in rats with sinoaortic deafferentation. *Brasilian J Med Biol Res*, v. 27: p. 775-781, 1994.

CHRISTMAN B, McPHERSON CD, NEWMAN JH, King GA et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, v. 327: p. 70-75, 1992.

CHU D, SULLIVAN CC, DU L, CHO AJ, KIDO M, et al. A new animal model for pulmonary hypertension based on the overexpression of a single gene, angiopoietin - 1. *General Thoracic*, v. 77(2): 449 - 457, 2004.

COLERIDGE HM, COLERIDGE JCG, DANGEL A, KIDD C et al. Impulses in slowly conducting vagal fibres from afferent endings in the veins, atria, and arteries of dogs and cats. *Circ Res*, v. 33: 87-97, 1973.

COOL CD, STEWART JS, WEHAREHA P, MILLER GJ et al. Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers: evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth. *Am J Pathol*, v. 155: p. 411-419, 1999.

CREAGER MA, CREAGER SJ. Arterial baroreflex regulation of blood pressures in patients with congestive heart failure. *J Am Col Cardiol*, v. 23 (2): 401-405, 1994.

CSIZAR A, LABINSKY N, OLSON S, PINTO J. Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Hypertension*, v. 54: p. 668-675. 2009.

DAICHO T, YAGI T, TAKANO S, MARUNOUCHI T, et al. Alterations in pharmacological action of the right ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Biol Pharm Bull*, v. 32 (8): p. 1378-1384, 2009.

DAVIE N, HALEEN SJ, UPTON PD, POLAK JM, et al. ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Resp Crit Care Med*, v. 165: p. 398-405, 2002.

DEMARCO VG, WHALEY-CONNELL AT, SOWERS JR, KEVIN CD, et al. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *World J Cardiol*, v. 2(10): p. 316-324, 2010.

DUMITRASCU R, KOEBRICH S, DONY E, WEISSMANN N, SAVAI R et al. Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury (Abstract). *BMC Pulm Med*, v. 8: p. 25, 2008.

ECKBERG DL, DRABINSKY M, BRAUNWALD E. Defective cardiac parasympathetic control in patients with heart disease. *N Engl J Med*, v. 285(16):p. 877-883, 1971.

ENOMOTO M, HARDER L. Dynamic Indices of Preload. *Crit Care Clin*, v. 26:p. 307-321, 2010.



FARBER HW & LOSCALZO J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, v. 351: p. 1655-65, 2004.

FARHAT MY, CHEN M, BHATTI T, IQBAL A, et al. Protection by oestradiol against the development of cardiovascular changes associated with monocrotaline pulmonary hypertension in rats. *Br J Pharmacol*, v. 110: p. 719-723, 1993.

FERRARI A, GORDON FJ, MARK AL. Impairment of cardiopulmonary baroreflexes in Dahl salt-sensitive rats fed low salt. *Am J Physiol*, v. 247: p. 119-123, 1984.

FERRARIO CM, CHAPPELL MC, TALLANT EA, BROSNIHAN KB, DIZ DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*, v. 30(2): p. 535-541, 1997.

FRANCHINI KG, KRIEGER EM, OLIVEIRA VLL. Hemodynamics of chemoreflex activation in unanesthetized rats. *Hypertension*, v. 30: p. 699-705, 1997.

FULTON RM, HUTCHINSON EC, JONES AM. Ventricular weight in cardiac hypertrophy, *Br Heart J*, v.14(3): p. 413-420, 1952.

GAINE SP, RUBIN LJ. Primary pulmonary hypertension. *Lancet*, v. 352: p. 719-725, 1998.

GALIE N, GHOFRANI HA, TORBICKI A, BARST RJ, et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, v. 353 (20): p. 2148-2157, 2005.

GIADID A, SALEH D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, v. 333: p. 214-221, 1995.

GIADID A, YANAGISAWA M, LAMGLEBEN D, MICHEL RP, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, v. 328: p. 1732-1739, 1993.

GOMEZ-ARROYO JG, FARKAS L, ALHUSSAINI AA, FARKAS D, et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 302: p. 363-369, 2012.

GRIBBIN B, PICKERING TG, SLEIGHT P, PETO R. Effect of age and high blood pressure on baroreflex sensitivity in man. *Circ Res*, v.29(4): p. 424-431, 1971.

HAIBARA AS, COLOMBARI E, CHIANCA DA Jr, BONAGAMBA LG, et al. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *Am J Physiol*, v. 269: p. 1421-1427, 1995.

HAIBARA AS, TAMASHIRO E, OLIVAN MV, BONAGAMBA LG, MACHADO BH. Involvement of the parabrachial nucleus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Auton Neurosci*, v. 101 (1-2): p. 60-67, 2002.

HANEDA T, NAKAJIMA T, SHIRATO K, ONODERA S, et al. Effects of oxygen breathing on pulmonary vascular input impedance in patients with pulmonary hypertension. *Chest*, v. 83: p. 520-527, 1983.

HARDINGHAM GE, C HAWLA S, JOHNSON CM, BADING H. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature*, v. 385: p. 260-265, 1997.

HEAD GA, McCARTY R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. *J Auton Nerv Syst*, v. 21: p. 203-213, 1987.

HENRY RA, LU I-Li, BEIGHTOL LA, ECKBERG DL. Interactions between CO<sub>2</sub> chemoreflexes and arterial baroreflexes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 274: p. 2177-2187, 1998.

HERING E. Über eine reflectorische Beziehung zwischen Lunge und Herz. *Sitzber Akad Wiss Wien*, v. 64: p. 333-353, 1871.

HIROSE S, HOSODA Y, FURUYA S, OTSUKI T, IKEDA E. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor correlates closely with formation of the plexiform lesion in human pulmonary hypertension. *Pathol Int*, v. 50: p. 472-479, 2000.

HONING ML, SMITS P, MORRISON PJ, RABELINK TJ. Bradykinin-induced vasodilation of human forearm resistance vessels is primarily mediated by endothelium-dependent hyperpolarization. *Hypertension*, v. 35: p. 1314-1318, 2000.

HOORN CM, ROTH RA. Monocrotaline pyrrole-induced changes in angiotensin-converting enzyme activity of cultured pulmonary artery endothelial cells. *Br J Pharmacol*, v. 110: p. 597-602, 1993.

HUMBERT M, SITBON O, CHAOUAT A, BERTOCCHI M, et al. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 173: p. 1023-1030, 2006.

INOUE H, YANO K, NOTO T, TAKAGI M, IKEO T, KIKKAWA K. Acute and chronic effects of T-1032, a novel selective phosphodiesterase type 5 inhibitor, on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Biol Pharm Bull*, v. 25 (11): 1422-1426, 2002.

IRIGOYEN MC, KRIEGER EM. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 31: p. 1213-1220, 1998.

ISHIKAWA M, SATO N, ASAI K, TAKANO T, MIZUNO K. Effects of pure  $\alpha/\beta$  -adrenergic receptor blocker on monocrotaline - induced pulmonary arterial hypertension with right ventricular hypertrophy in rats. *Circulation J*, v. 73(12): p. 2337-2341, 2009.

ITO KM, SATO M, USHIJIMA K, NAKAI M, ITO K. Alterations of endothelium and smooth muscle function in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 279: p. 1786-1795, 2000.

ITO S, SVED AF. Pharmacological profile of depressor response elicited by sarthran in rat ventrolateral medulla. *Am J Physiol Heart Circ*, v. 279: p. 2961-2966, 2000.

COCKCROFT JR, CHOWIENCZYK PJ, BRETT SE, BENDER N, RITTER JM. Inhibition of bradykinin-induced vasodilation in human forearm vasculature by icatibant, a potent B2-receptor antagonist. *Br J Clin Pharmacol*, v. 38(4): p. 317-321, 1994.

HOROWITZ JD, BRENNAN JB, OLIVER LE, HARDING D, GOBLE AJ, LOUIS WJ. Effects of captopril (SQ 14,225) in a patient with primary pulmonary hypertension. *Postgrad Med J*, v. 57(664): p. 115-116, 1981.

JACOB HJ, ALPER RH, BRODY MJ. Peripheral mechanism regulating arterial pressure lability in rats. *Fed Proc*, v. 45(4): p. 876, 1986.

JACOB HJ, BARRES CP, MACHADO BH, BRODY MJ. Studies on neural and humoral contributions to arterial pressure lability. *Am J Med Sci*, v. 295: p. 341-345, 1988.

JASMIN JF, LUCAS M, CERNACEK P, DUPUIS J. Effectiveness of a nonselective ET<sub>A/B</sub> and a selective ET<sub>A</sub> antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, v. 103: p. 314-318, 2001.

KANE GC, MARADIT-KREMERS H, SLUSSER JP, SCOTT CG, FRANTZ RP, MCGOON MD. Integration of clinical and hemodynamic parameters in the prediction of long-term survival in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest*, v.139(6): p. 1285-1293, 2011.

KANNO S, WU Y L, LEE PC, BILLIAR TR, HO C. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Preserves p21 and Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression in Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *Circulation*, v.104: p. 945-950, 2001.

KAPPAGOGA CT, LINDEM RJ, SNOW HM. The effect of stretching the superior vena cava-right atrial junction on right atrial receptors in the dog. *J Physiol*, v. 227, p. 875-887, 1972.

KAR S, GAO L, ZUCKER IH. Central ang-(1-7) enhances baroreflex gain in conscious rabbits with heart failure. *Hypertension*,58(4): p. 627-634, 2011.

KARA T, NARKIEWICZ K, SOMERS VK. Chemoreflexes - physiology and clinical implications. *Acta Physiol Scand*, v. 177: 377-384, 2003.

KAUFMAN MP, BAKER DG, COLERIDGE HM. Stimulation by bradykinin of afferent vagal C-fibers with chemosensitive endings in the heart and aorta of the dog. *Circ Res*, v. 46: p. 476-484, 1980.

KAY, J.M., KEANE, P.M., SUYAMA, K.L. & GAUTHIER, D. Angiotensin converting enzyme activity and evolution of pulmonary vascular disease in rats with monocrotaline pulmonary hypertension. *Thorax*, v.37: p. 88-96, 1982.

KEEBLE W, TYMCHAK WJ. Triggering of the Bezold Jarisch Reflex by reperfusion during primary PCI with maintenance of consciousness by cough CPR: a case report and review of pathophysiology. *J Invasive Cardiol*, v. 20(8): p239-242, 2008.

KINSELLA SM, TUCKEY JP. Perioperative bradycardia and asystole: relationship to vasovagal syncope and the Bezold-Jarisch reflex. *Br J Anaesth*, v. 86: p. 859-868 2001.

KOOB GF, ANNAU Z. Effect of hypoxia on hypothalamic mechanisms. *Am J Physiol*, v. 224: p. 1403-1408, 1974.

KREUTZ R, ALFONSO MS, GANTEN D, PAUL M. Effect of losartan on right ventricle hypertrophy and cardiac angiotensin I-converting enzyme in pulmonary hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*, v. 18(1): p. 101-11, 1996.

KUGA T, MOHRI M, EGASHIRA K, HIRAKAWA Y, et al. Bradykinin-induced vasodilation of human coronary arteries in vivo: role of nitric oxide and angiotensin converting enzyme. *J Am Coll Cardiol*, v. 30: p. 108-112, 1997.

KUNZE DL, KRAHUHS JM, ORLEA CJ. Direct action of norepinephrine on aortic baroreceptors of rat adventitia. *Am J Physiol*, v. 16: p. 811-816, 1984.

LAI CJ, YANG CCH, HSU YY, LIN YN, KUO TBJ. Enhanced sympathetic outflow and decreased baroreflex sensitivity are associated with intermittent hypoxia-induced systemic hypertension in conscious rats. *J Appl Physiol*, v. 100: p. 1974-1982, 2006.

LAI YL, THACKER AA, DIANA JN. Hypoxemia and elevated tachykinins in rat monocrotaline pneumotoxicity. *Lung*, v. 174: p. 195-203, 1996.

LAM SY, LEUNG PS. Chronic hypoxia activates a local angiotensin-generating system in rat carotid body. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 203 (1-2): p. 147-153, 2003.

LARUMBE MTC, ESCOBOZA JRB. Factores del sistema hemostático y function endotelial em la hipertensión pulmonare primaria. *Rev Invest Clin*, v. 46: p. 421-425, 1994.

LE CRAS, ROBERT C. Effects of cronic hypoxia and altered hemodynamics on endothelial nitric oxide syntase and preproendothelin-1 expression in the adult rat lung. *Chest*, v. 114: p.35-36, 1998.

LEE J, REICH R, XU F, SEHGAL PB. Golgi, trafficking, and mitosis dysfunctions in pulmonary arterial endothelial cells exposed to monocrotaline pyrrole and NO scavenging. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 297: p.715-728, 2009.

LEE Y-S, BYUN J, KIM J-A, LEE J-S, et al. Monocrotaline-induced pulmonary hypertension correlates with upregulation of connective tissue growth factor expression in the lung. *Exp Mol Med*, v. 37(1): p. 27-35, 2005.

LEIER C, BAMBACH D, NELSON S, HERMILLER J, et al. Captopril in primary pulmonary hypertension. *Circulation*, v. 67(1): p.155-161, 1983.

LEUNG P, LAM S, FUNG M. Chronic hypoxia upregulates the expression and functions of AT<sub>1</sub> receptors in rat carotid body. *Journal of Endocrinology*, v.167: p. 517-524, 2000.

LEUNG P. S., FUNG M. L., TAM M.S.C. Renin-angiotensin system in the carotid body. *Int J Biochem Cell B*, v. 35 (6): p. 847-854, 2003.

LIPWORTH JB, DAGG k. Vasoconstrictor effects of angiotensin II on the pulmonary vascular bed. *Chest*, v.105: p.1360-64, 1994.

LONGHURST JC. Cardiac receptors: Their function in health and disease. *Prog Cardiovasc Dis*, v.27: p. 201–222, 1984.

LOPES OU, PALMER JF. Proposed respiratory “gating” mechanism for cardiac slowing. *Nature*, v. 264: p. 454 - 456, 1976.

LOUIE EK, LIN SS, REYNERTSON SL, WEBER KT, et al. Primary pulmonary hypertension, vasculature structure, morphometry, and responsiveness to vasodilator agents. *Circulation*, v. 92: p. 819-824, 1995.

LOURENÇO AP, ALBUQUERQUE JR. RR, SILVA CB, FARIA B, et al. Myocardial dysfunction and neurohumoral activation without remodeling in left ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 291: p. 1587-1594, 2006.

LUDKE AR, MOSELE F, CARON-LIENERT R, RIBEIRO MF et al. Modulation of monocrotaline-induced cor pulmonale by grape juice, v. 55(1): p. 89-95, 2010.

MACFAYDEN RJ, LEES KR, REID JL. Differences in first dose response to angiotensin converting enzyme inhibition in congestive heart failure: a placebo controlled study. *Br Heart J*, v. 66: p. 206-211, 1991.

MCGOON MD, KUSHWAHA SS. Pulmonary arterial hypertension: current therapeutic strategies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, v. 4(6): p. 319-29, 2007.

MAIA LG, RAMOS MC, FERNANDES, DE CARVALHO MH, et al. Angiotensin-(1-7) Antagonist A-779 Attenuates the Potentiation of Bradykinin by Captopril in Rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 43(5): p. 685-91, 2004.

MALAN A. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and poikilotherm. *Respir Physiol*, v. 17: p. 32-44, 1973.

MAN FS, TU L, HANDOKO ML, RAIN S, et al. Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 186(8): p. 780-789, 2012.

MARCUS NJ, LI YL, BIRD CE, SCHULTZ HD, MORGAN BJ. Chronic intermittent hypoxia augments chemoreflex control of sympathetic activity: role of the angiotensin II type 1 receptor. *Respir Physiol Neurobiol*, v. 171(1): p. 36-45, 2010.

MARK AL. The Bezold-Jarisch reflex revisited: clinical implications of inhibitory reflexes originating in the heart. *Am Coll Cardiol*, v. 1: p. 90-102, 1983.

MARK MD, KERBER RE. Augmentation of cardiopulmonary baroreflex control of forearm vascular resistance in borderline hypertension. *Hypertension*, v. 4(1): p. 39-46, 1982.

MARQUARDT D W. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Indust Appl Math*, v. 11: p. 431-41, 1963.

MARSHALL HW, CLARKE JA, DALY JM, HENNESSY EM. Quantitative studies of the vasculature of the carotid body in the chronically hypoxic rat. *Braz J Med Biol Res*, v. 33: p. 331-340, 2000.

MARSHALL JM. Analysis of cardiovascular response evoked following changes in peripheral chemoreceptor activity in the rat. *J Physiol*, v. 394: p. 393-414, 1987.



MARSHALL P. The pulmonary renin-angiotensin system. *Curr Pharm Des*, v. 9: p. 715-722, 2003.

MAUAD H, GLASS ML, MACHADO BH. Effect of selective denervation of baroreceptors on pulmonary ventilation and arterial pressure lability. *Hypertension*, v. 19: p. 182-186, 1992.

MCLAUGHLIN VV, ARCHER SL, BADESCH BD, BARST RJ et al. ACCF/AHA 2009 Expert Consensus Document on Pulmonary Hypertension. *JACC Vol.* 53 (17):1573-619, 2009.

McLAUGHLIN VV, McGOON MD. Pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, v. 114: p. 1417-1431, 2006.

McQUILLAN LP, LEUNG GK, MARSDEN PA, KOSTYK SK, KOUREMBANAS S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanism. *Am J. Physiol*, v. 267(5): p. 1921-1927, 1994.

METZGER R, FRANKE FE, BOHLE RM, ALHENC-GELAS F, DANILOV SM. Heterogeneous distribution of angiotensin I-converting enzyme (CD143) in the human and rat vascular systems: vessel, organ and species specificity. *Microvascular Research*, v. 81: p. 206-215, 2011.

MEYRELLES SS, BERNARDES CF, MODOLO RP, MILL JG, VASQUEZ EC. Bezold-Jarisch reflex in myocardial infarcted rats. *J Auton Nerv Syst*, v. 63 (3): p. 144-152, 1997.

MEYRELLES, S. S; CABRAL, A. M; VASQUEZ, E. C. Impairment of the Bezold-Jarisch reflex in conscious rats with myocardial hypertrophy. *Braz J Med Biol Res*, v. 27(4):p. 1065-1069, 1994.

MICHARD F. Changes in arterial pressure during mechanical ventilation. *Anesthesiology*, v.103(2): p. 419-428, 2005.

MICHELINI LC. Mecanismos neuro-humorais na regulação reflexa da pressão arterial. In: Hipertensão Arterial: Presente e Futuro. Tavares LA, Lima EG, Vasquez EC. Fundo Editorial Bik, São Paulo, p. 13-36, 1989.

MOLTENI A, WARD W, TS'AO C, SOLLIDAY N. Monocrotaline-induced cardiopulmonary damage in rats: amelioration by the angiotensin-converting enzyme inhibitor CL242817. *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 182(4): p. 483-493, 1986.

MOLTENI A, WARD W, TS'AO C, Port CD, SOLLIDAY N. Monocrotaline-induced pulmonary endothelial dysfunction in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 176(1): p. 88-94, 1984.

MOLTHEN R, WU QP, BAUMGARDT S, KOHLHEPP L, et al. Morphology responds differently to captopril than n-acetylcysteine in a monocrotaline rat model of pulmonary hypertension. *Medical Imaging*, v. 7626: p. 7626151-76261510, 2010.

MORITA K, OGAWA Y, TOBISE K. Effect of endothelium of pulmonary artery vasoreactivity in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Jpn Circ*, v. 60: p. 585-592, 1996.

MORREL N, ATOCHINA E, MORRIS K. Angiotensin converting enzyme expression is increased in small pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension *J. Clin. Invest*, v. 96: p. 1823-1833, 1995.

MORRELL NW, MORRIS KG, STENMARK KR. Role of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II in development of hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol*, v. 269(4 Pt 2): p.1186-1194, 1995.

MORTARA A, ROVERE MT, PINNA GD, MAESTRI R et al. Arterial baroreflex modulation of heart rate in chronic heart failure: clinical and hemodynamic correlates and prognostic implications. *Circulation*, v. 96(10): p. 3450-3458, 1997.

MOSTARDA C, MORAES-SILVA IC, MOREIRA ED, MEDEIROS A, et al. Baroreflex sensitivity impairment is associated with cardiac diastolic dysfunction in rats. *J Card Fail*, v. 17(6): p. 519-525, 2011.

NAGAYA N, NISHIKIMI T, UEMATSU M, ET AL. Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation*; v. 102: p. 865-870, 2000.

NAGAYA N, OKUMURA H, UEMATSU M, SHIMIZU W, et al. Repeated inhalation of adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 285: p. 2125-2131, 2003.

NAKAZAWA H, HORI M, OZAKI H, KARAKI H. Mechanisms underlying the impairment of endothelium-dependent relaxation in the pulmonary artery of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, v. 128: p. 1098-1104, 1999.

NICOLLS MR, TARASEVICIENE-STEWART L, BADESCH DB, VOELKEL NF. Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. *Eur Respir J*, v. 26: p. 1110-1118, 2005.

NIHEI M, LEE JK, HONJO H, YASUI K, et al. Decreased vagal control over heart rate in rats with right-sided congestive heart failure. *Circ J*, v. 69: p. 493-499, 2005.

NOOTENS M, KAUFMANN E, RECTOR T, et al. Neurohormonal activation in patients with right ventricular failure from pulmonary hypertension: relation to hemodynamic variables and endothelin levels. *J Am Coll Cardiol*, v. 26: p. 1581-1585, 1995.

NOOTENS M, WOLFKIEL C, CHOMKA EV, RICH S. Understanding right and left ventricular systolic function and interactions at rest and with exercise in primary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol*, v. 75: p. 374-377, 1995.

OKADA M, KIKUZUKI R, HARADA T, HORI Y, et al. Captopril Attenuates Matrix Metalloproteinase-2 and -9 in Monocrotaline-Induced Right Ventricular Hypertrophy in Rats. *J Pharmacol Sci*, v. 108 (4): p. 487-494, 2008.

OLSON TP, FRANTZ RP, TURNER ST, BAILEY KR, et al. Gene Variant of the Bradykinin B2 Receptor Influences Pulmonary Arterial Pressures in Heart Failure Patients. *Clin Med Circ Respirat Pulm Med*, v. 17(3): p. 9-17, 2009.

PAFFETT ML, WALKER BR. Vascular adaptations to hypoxia: molecular and cellular mechanisms regulating vascular tone. *Essays Biochem*, v. 43: p. 105-119, 2007.

PAINTAL AS. The study of ventricular pressure receptors and their role in the Bezold - Jarisch reflex. *Q J Exp Physiol*, v. 40: p. 348-363, 1995.

PALEVSKY HI, SCHLOO BL, PIETRA GG, WEBER KT, et al. Primary pulmonary hypertension. Vascular structure, morphometry, and responsiveness to vasodilator agents. *Circulation*, v. 80(5): p. 1486-88, 1989.

PATAKAS D, LOURIDAS G, KAKAVELAS E. Reduced baroreceptor sensitivity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, v. 37(4): p. 292-295, 1982.

PEACH M J. The rennin-angiotensin system: biochemistry and mechanism of action. *Physiol Rev*, v. 55: p. 313-369, 1977.

PECHÁNOVÁ O. Contribution of captopril thiol group to the prevention of spontaneous hypertension. *Physiol Res*, v.56(2): p. 41-48, 2007.

PETROV L, ATANASSOVA M, ALEXANDROVA A. Comparative study of the antioxidant activity of some thiol-containing substances. *Cent Eur J Med*, v. 7(2): p. 269-273, 2012.

PIGAZZI A, HEYDRICK S, FOLLI F, BENOIT S, MICHELSON A, LOSCALZO J. Nitric oxide inhibits thrombin receptor-activating peptide-induced phosphoinositide 3-kinase activity in human platelets. *J Biol Chem*; 274: 14368-14375, 1999.

PORCELLI R, VIAU A, DEMENY M, NAFTCHI N, BERGOFISKY H. Relation between hypoxi pulmonary vasoconstriction, its humoral mediators and alpha-beta adrenergics receptors. *Chest*, v. 71: p. 249-251, 1977.

PRIÉ S, STEWART DJ, DUPUIS J. Endothelin - A receptor blockade improves nitric oxide-mediated vasodilation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 172: p. 358-363, 1998.

QING G, GARCIA R. Chronic captopril and losartan (DuP 753) administration in rats with high-output heart failure. *Am J Physiol*, v. 263(3 Pt 2): p.833-840, 1992.

RAUT MS, MAHESHWARI A. Clinical Implication of Cough CPR in Cardiac Cath Lab. *The Indian Anaesthetists' Forum*. February 2013, v.14(2): p. 1-4

REINDEL JF, GANEY PE, WAGNER JG, SLOCOMBE RF, ROTH RA. Development of morphologic, hemodynamic, and biochemical changes in lungs of rats given monocrotaline pyrrole. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.106: p.179-200, 1990.

REIS A, ROCHA N, BARROS R, MARTINS A, et al. Recomendações para abordagem clínica do doente com hipertensão pulmonar. *Ver Port Cardiol*, v. 29(2): p. 253-89, 2010.

RICH S, MARTINEZ J, LAM W, ROSEN KM. Captopril as treatment for patients with pulmonary hypertension - problem of variability in assessing chronic drug treatment. *Br Heart J*, v. 48: p. 272-77, 1982.

RICHARDS AM, IKRAM H, CROZIER IG, et al. Ambulatory pulmonary arterial pressure in primary pulmonary hypertension: variability, relation to systemic arterial pressure, and plasma catecholamines. *Br Heart J*, v. 63: p. 103-108, 1990.

ROKS AJM, VAN GEEL PP, PINTO YM, BUIKEMA H, et al. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human rennin-angiotensin system. *Hypertension*, v. 34: p. 296-301, 1999.

RUBIN LJ, BADESCH DB, BARST RJ. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, v. 346:p. 896-903, 2002.

RUBIN LJ, SIMONNEAU G, GALIE N et al. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, v. 43: p.5-12, 2004.

RUBIN LJ. Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, v. 336(2): p. 111-17, 1997.

RUIZ-ORTEGA M, ESTEBAN V, EGIDO J. The Regulation of the Inflammatory Response Through Nuclear Factor- $\kappa$ B Pathway by Angiotensin IV Extends the Role of the Renin Angiotensin System in Cardiovascular Diseases. *Trends Cardiovasc Med*, v.17 (1): p.19-25, 2007.

RUNO JR & LOYD JE. Primary pulmonary hypertension. *Lancet*, v. 361: p.1533-44, 2003.

SAAVEDRA J M. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev*, v. 13: p. 329-280, 1992.

SALVI SS.  $\alpha_1$ -Adrenergic hypothesis for pulmonary hypertension. *Chest*, v. 115: p. 1708-1719, 1999.

SANYAL SN, ONO K. Derangement of autonomic nerve control in rat with right ventricular failure. *Pathophysiology*, v.8(3): p.197-203, 2002.

SAPRU HN & KRIEGER AJ. Carotid and aortic chemoreceptor function in rat. *Exercise Physiol*, v. 42(3): p. 344-48, 1977.

SCHERMULY RT, KREISSELMEIER KP, GHOFrani HA, YILMAZ H, et al. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 169: 39-45, 2004.

SCHULTZE AE, ROTH RA. Fibrinolytic activity in blood and lungs of rats treated with monocrotaline pyrrole. *Toxicol and Appl Pharm*, v.121: p.129-137, 1993.

SCHWENKE DO, PEARSON JT, SHIMOCHI A, KANGAWA K, et al. Changes in pulmonary blood flow distribution in monocrotaline compared with hypoxia-induced models of pulmonary hypertension: assessed using synchrotron radiation. *J Hypertens*, v. 27(7): p. 1410-1419, 2009.

SEGEL N, HARRIS P, BISHOP J. The effects of synthetic hypertension of the systemic and pulmonary circulations in man. *Clin Sci*, v. 20: p. 49-61. 1961.

SHENOY V, FERREIRA AJ, QI Y, FRAGA-SILVA RA, DÍEZ-FREIRE C et al. The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 182: p. 1065-1072, 2010.

SHEPHERD JT, MANCIA G. Reflex control of the human cardiovascular system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, v. 105: p. 3-100, 1986.

SHIN CY, CHOI WS, YI I, NAN MH, MYUNG CS. Synergistic decrease in blood pressure by captopril combined with losartan in spontaneous hypertensive rats. *Arch Pharm Res*, v. 32(6): p. 955-962, 2009.

SIMONNEAU G, ROBBINS IM, BERGHETTI M, CHANNICK RN, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, v. 54, p. 43-54, 2009.

SIMONNEAU G, GATZOULIS MA, ADATIA I, CELERMAJER D, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, v.54: p. 34-41, 2013.

SINGH SB, SELVAMURTHY M. Effect of intermittent chronic exposure to hypoxia on feeding behaviour of rats. *Int J Biometeorol*, v. 37: p. 200-202, 1993.

SITBON O, HUMBERT M, NUNES H, PARENT F, et al. Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *J Am Coll Cardiol*, v. 40, p. 780-788, 2002.

SPYER KM, GOURINE, A.V. Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci*, v. 364: p. 2603 - 2610, 2009.

SPYER KM. The central nervous organization of reflex circulatory control. In: Central Regulation of autonomic Functions. *Edited by Loewy AD, Spyer KM, Oxford University Press*, p. 168-188, 1990.

STENMARK KR, DAVIE N, FRID M, GERASIMOVSKAYA E, DAS M. Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology*, v. 21: 134-145, 2006.

STENMARK KR, MEYRICK B, GALIE N, MOOI WJ, McMURTRY IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 297: p. 1013-1032, 2009.

SUGITA T, HYERS TM, DAUBER IM, WAGNER WW, MCMURTRY IF, REEVES JT. Lung vessel leak precedes right ventricular hypertrophy in monocrotaline- treated rats. *J Appl Physiol*, v. 54: 371-374, 1983.

SUYLEN RJ, SMITS JFM, DAEMEN MJAP. Pulmonary Artery Remodeling Differs in Hypoxia- and Monocrotaline-induced Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 157: 1423-1428, 1998.

SWEENEY M, YUAN JX. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: role of voltage-gated potassium channels. *Respir Res*, v. 1: p. 40-48, 2000.

SZABO G, SOOS P, BAHRLE S, et al. Adaptation of the right ventricle to increased afterload in the chronically volume overload heart. *Ann Thorac*, v. 82: p. 989-95, 2006.

TAKESHITA A, TANAKA S, KUROIWA A, NAKAMURA M. Reduced baroreceptor sensitivity in borderline hypertension. *Circulation*, v. 51(4): p.738-742, 1975.

TARASEVICIENE-STEWART L, KASAHARA Y, ALGER L, HIRTH P, et al. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J*, v. 15: p. 427-38, 2001.

THORÉN P. Role of cardiac vagal C-fibers in cardiovascular control. *Rev Physiol, Biochem Pharmacol*, v. 86: p. 1-94, 1980.

TRZEBSKY A. Arterial chemoreceptor reflex and hypertension. *Hypertens Dall*, v. 19: p. 562-566, 1992.

TUDER RM, COOL CD, GERACI MW, et al. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 159, p. 1925-32, 1999.

VASQUEZ EC, MEYRELLES SS, MAUAD H, CABRAL AM. Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. *Braz J Med Biol Res*, v. 30: p. 521-532, 1997.



VELEZ-ROA S, CIARKA A, NAJEM B, VACHIERY J, et al. Increased Sympathetic Nerve Activity in Pulmonary Artery Hypertension. *Circulation*, v. 110: p. 1308-1312, 2004.

WENSEL R, JILEK C, DORR M ET AL. Impaired cardiac autonomic control relates to disease severity in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, v. 34: p. 895–901, 2009.

WESTENDORP RG<sup>1</sup>, BLAUW GJ, FRÖLICH M, SIMONS R. Hypoxic syncope. *Aviat Space Environ Med*, v. 68(5): p. 410-414, 1997.

WILSON DW, SEGALL HJ, PAN LC, DUNSTON SK. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline- treated rats. *Microvasc Res*, v. 38: p. 57-80, 1989.

WILSON DW, SEGALL HJ, PAN LC, LAMÉ MW, ESTER JE, MORIN D. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Crit Rev Toxicol*, v. 22 (5/6): p. 307-325, 1992.

WING-GAIA SL, GERSHENOFF DC, DRUMMOND MJ, ASKEW EW. Effect of leucine supplementation on fat free mass with prolonged hypoxic exposure during a 13-day trek to Everest Base Camp: a double-blind randomized study. *Nutr metabolism*, v. 39(3): p.318-323, 2014.

WRIGHT JW, HARDING JW. Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Research Rev*, v.17: p. 227-262, 1992.

XIE L, LIN P, XIE H, XU C.Effects of atorvastatin and losartan on monocrotaline-induced pulmonary artery remodeling in rats. *Clin Exp Hypertens*, v. 32(8): 547-554, 2010.

YAMAZATO Y, FERREIRA AJ, HONG K, SRIRAMULA S, et al. Prevention of Pulmonary Hypertension by Angiotensin-Converting Enzyme 2 Gene Transfer *Hypertension*, v. 54: p. 365-371, 2009.

YU AY, SHIMODA LA, IYER NV, HUSO DL, et al. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *J Clin Invest*, v. 103(5): p. 691-696, 1999.

YUYAMA H, FUJIMORI A, SANAGI M, KOAKUTSU A, et al. The orally active nonpeptide selective endothelin ET<sub>A</sub> receptor antagonist YM598 prevents and reverses the development of pulmonary hypertension in monocrotaline-treated rats. *Eur J. Pharmacol*, v. 496: p. 129-39, 2004.

ZANCHETTI A, MANCIA G. Cardiovascular reflexes and hypertension. *Hypertension*, v. 18(5): p.13-21, 1991.

ZIN, W.A. Controle da ventilação. Em: Fisiologia, Ed.: Aires, M.M.Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 485-491, 1991.

ZINI S, FOURNIE-ZALUSKI MC, CHAUVEL E, ROQUES BP, et al. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci*, v.93: p. 11968-11973, 1996.

## **ANEXOS**

## ANEXO I

**Tabela 1: Atualização da Classificação da Hipertensão Pulmonar (Nice, França, 2013)**

---

### **1. Hipertensão arterial pulmonar (HAP)**

- 1.1. Idiopática
- 1.2. Hereditária
  - 1.2.1. BMPR2
  - 1.2.2. ALK1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3
  - 1.2.3 Desconhecida
- 1.3. Induzida por drogas ou toxinas
- 1.4. Associada com:
  - 1.4.1 Doenças do tecido conectivo
  - 1.4.2. HIV
  - 1.4.3. Hipertensão portal
  - 1.4.4. Doenças cardíacas congênicas
  - 1.4.5. Esquistossomose

1'Doença veno-oclusiva pulmonar (DVOP) e / ou Hemangiomatose capilar pulmonar

1" Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido

### **2. Hipertensão pulmonar devido à doença do coração esquerdo**

- 2.1. Disfunção sistólica do ventrículo esquerdo
- 2.2. Disfunção diastólica do ventrículo esquerdo
- 2.3. Doença valvular
- 2.4. Obstrução congênita / adquirida da via de entrada / saída de coração esquerdo e miocardiopatias congênicas

### **3. Hipertensão pulmonar devido a doenças pulmonares e/ou hipóxia**

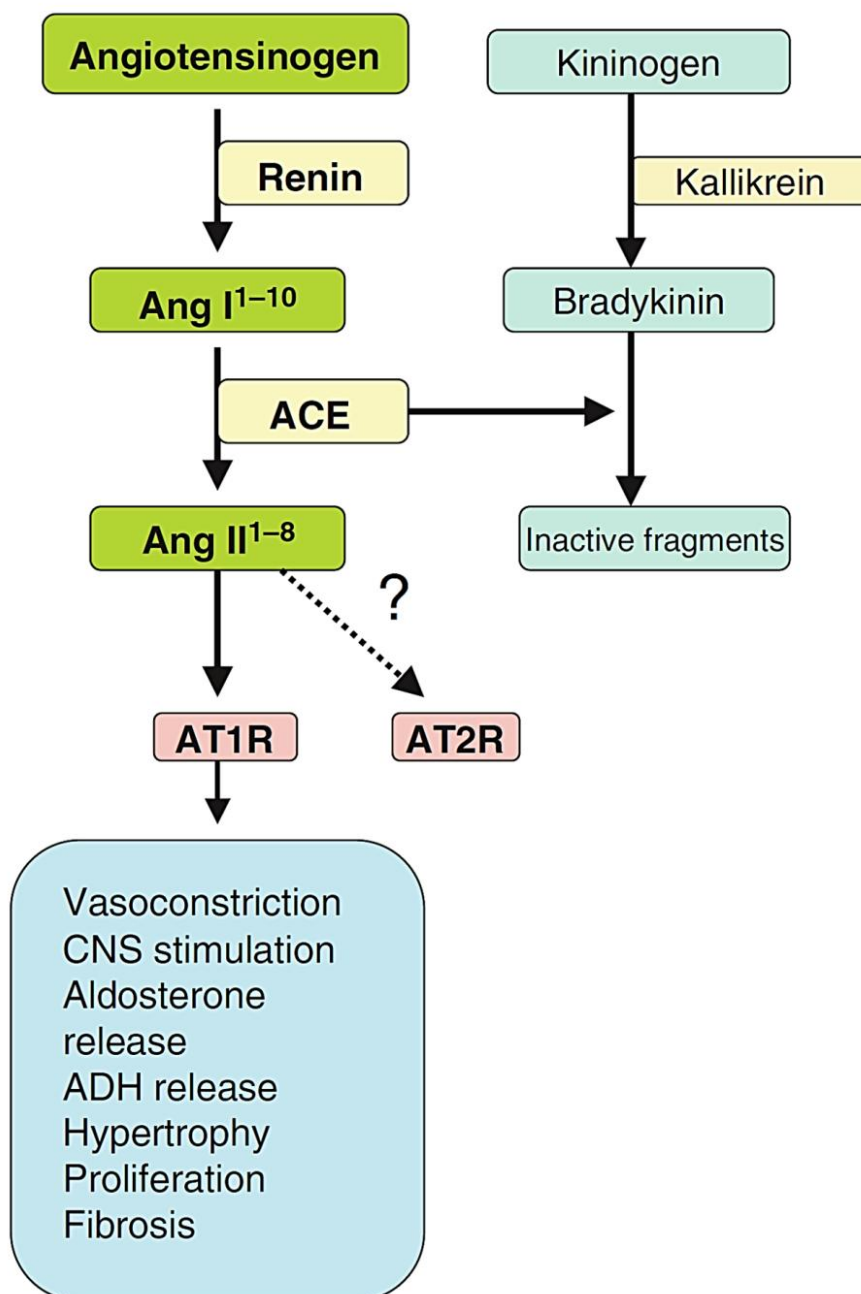
- 3.1. DPOC
- 3.2. Doença pulmonar intersticial
- 3.3. Outras doenças pulmonares combinando obstrutivas com restritivas
- 3.4. Síndrome da apnéia do sono
- 3.5. Hipoventilação alveolar
- 3.6. Exposição crônica a altas altitudes
- 3.7. Desenvolvimento de anormalidades

### **4. Hipertensão pulmonar tromboembólica crônica**

### **5. Hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais desconhecidos**

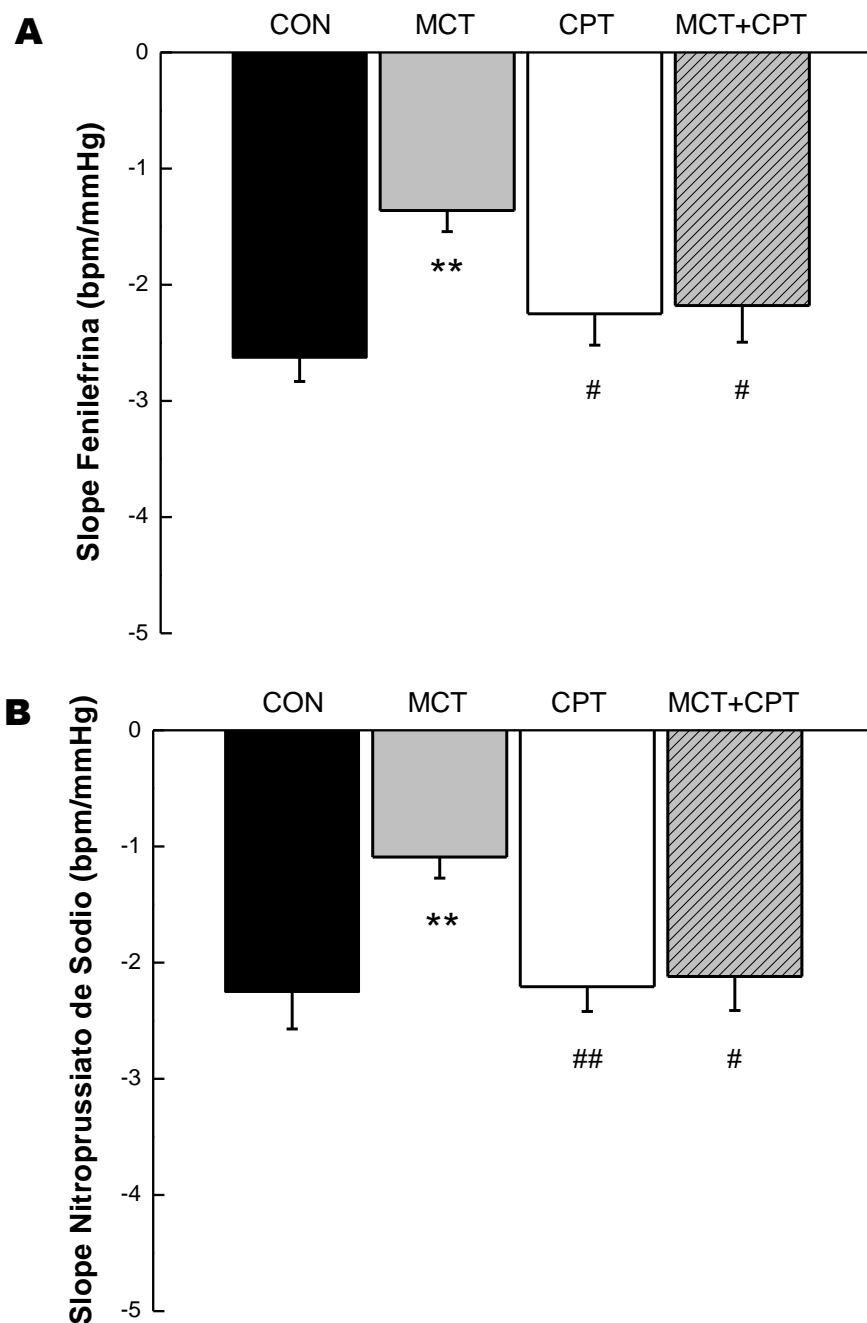
- 5.1. Desordens hematológicas: anemia hemolítica crônica, distúrbios mieloproliferativos, esplenectomia
  - 5.2. Desordens sistêmicas: sarcoidose, histiocitose pulmonar, linfangioleiomiomatose
  - 5.3. Desordens metabólicas: doença do armazenamento de glicogênio, doença de Gaucher, distúrbios da tireóide
  - 5.4. Outros: obstrução tumoral, mediastinite fibrosante, insuficiência renal crônica, HP segmentar
-

## ANEXO II



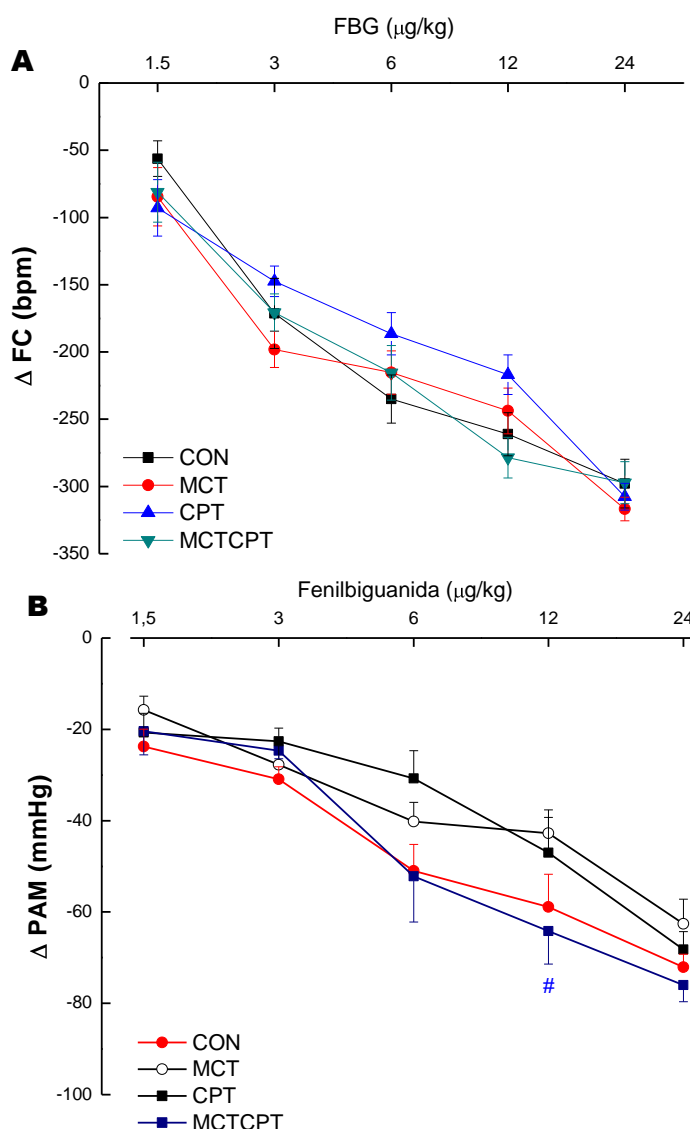
A figura ilustra uma visão simplificada do sistema renina-angiotensina. As setas negras indicam as vias. As setas hachuradas indicam as vias deduzidas de experimentos animais e culturas de células (reproduzido de F. Fyhrquist & O. Saijonmaa, 2008).

## ANEXO III



Figuras ilustrativas dos *Slopes* em resposta à fenilefrina (A) e em resposta ao nitroprussiato de sódio (B) dos grupos CON, MCT, CPT e MCT+MCT. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT. A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.

## ANEXO IV



A figura ilustra em valores absolutos as variações da frequência cardíaca (FC) (Painel A) e da pressão arterial média (PAM) (Painel B) em resposta às diferentes doses de FBG: 1,5 $\mu\text{g/Kg}$ , 3 $\mu\text{g/Kg}$ , 6 $\mu\text{g/Kg}$ , 12 $\mu\text{g/Kg}$  e 24 $\mu\text{g/Kg}$  dos grupos CON, MCT, CPT e MCT+MCT. # $p < 0,05$ . A análise estatística utilizada foi o método de Análise de Variância (ANOVA) com *pos hoc* de Fisher.